



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona



TESIS DOCTORAL

Nuevas estrategias terapéuticas para limitar el desarrollo del aneurisma de aorta abdominal: inhibición del estrés del retículo endoplasmático y mitocondrial

Autor: Miquel Navas Madroñal

Directora: María Galán Arroyo

Tutor: Francisco Blanco Vaca

Programa doctorado de Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina

Departamento: Bioquímica y biología molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

2019

Esta tesis se ha realizado en el IIB-Sant Pau bajo el programa de doctorado de Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina del Departamento de Bioquímica y Biología molecular de la Universidad autónoma de Barcelona. La supervisión de esta tesis ha estado a cargo de la Dra. María Galán Arroyo y bajo la tutela del Dr. Francisco Blanco Vaca.

Miquel Navas Madroñal

(Doctorando)

Dra. María Galán Arroyo

(Directora)

Barcelona, Junio de 2019

A mis padres y mi hermano

A Ana

AGRADECIMIENTOS

Un día antes de la tesis y todavía no había ni pensado en los agradecimientos... y la verdad es que, tras 10 años en Sant Pau, este apartado podría ser perfectamente el más largo de la tesis (pero trataré de ser breve). Viendo como un final de etapa se acerca tras todo este tiempo, miro atrás y no puedo más que dar las gracias a todos los que han estado a mi lado.

El camino no ha sido fácil, ha estado lleno altibajos, al final entiendes que la ciencia es así, no generas respuestas, solo creas preguntas más concisas. Pero a esta conclusión no llegas por ti mismo, es por ello que quiero empezar agradeciendo esta tesis a mi directora de tesis. Muchas gracias María, sin ti esto no habría sido posible, me has guiado durante todos estos años, has tenido una paciencia sobrehumana conmigo y sobre todo has tenido mucha empatía en los momentos más difíciles.

También tengo que agradecer a Pepe y Cristina por estar siempre dispuestos a echar una mano y por dejarme formar parte del laboratorio 110, un laboratorio al que también le tengo que agradecer muchas cosas: a Silvi por estar siempre ahí para ofrecer unas galletas, a la Ingrid por ser la meva profe en els primers moments, a la Laia por les classes de cultura valenciana, a Saray por ser mi compi de congressos, a la Mar por ser un pou de saviesa i ensenyar-me que hi ha vida després de la tesi, a Judith por los momentos culinarios compartidos. A Carme, Marta y Laura, las últimas en llegar a mi camino, solo os puedo desear lo mejor en esta aventura que tenéis por delante.

Gracias también al LABVI, a Mercedes por hacerme un hueco en el laboratorio y por todas las charlas que han hecho esta tesis más amena. A la Marta por totes les converses matutines i per tot lo après

sobre la trementina. A Sonia y Teresa, solamente deciros que habéis sido un fantástico y maravilloso apoyo en esta tesis. Gracias por las risas, el café de por la mañana y todos los momentos divertidos. Habéis sido unas compis de labo únicas y solo espero que a partir de ahora sea más fácil ponernos de acuerdo para tomar algo.

A pesar de que quedan más atrás en el tiempo, esta tesis no estaría completa sin darle las gracias a todos los que estuvieron antes. A Toni por ser el mejor negrero que he tenido hasta ahora, a la Isabel, l'Edu, la Noemí i la Fina perquè amb vosaltres va començar tot això. Al Ricard que em va fer entendre els gangliòsids, a Luis y Gisela por enseñarme la pasión por la ciencia, al Jordi per ser, d'alguna manera, el meu primer director de tesi, sense la teva motivació i energia mai hagués arribat aquí. A Sonia, todavía sigo echando de menos esas charlas culinarias i al Xavi i la Bàrbara, per tots els moments viscuts i per ser els meus germans de TBS.

Han sido muchos momentos vividos en Sant Pau y muchas personas las que me dejo en el tintero, a David y su inestimable ayuda con la estadística, a la Gemma i els seus acudits de WhatsApp, a Javi el visionario que vio mi futura boda, al Sergi que sempre tenia alguna solució a l'estabu, a Soumaya y Carmen que han sido soporte moral durante la escritura y en definitiva, a todos los que habéis estado ahí en algún momento. Habéis sido muchos y seguro que me olvido a alguno. A todos, gracias.

Ciertamente he aprendido mucho por el camino, pero de casa también se traen aprendidas muchas cosas, así que no puedo dejar de darle las gracias a mi familia, a mis padres por todos los esfuerzos, por todo el cariño y por el constante apoyo, y a mi hermano por tener siempre

tiempo para mí y por tener siempre una sonrisa en la cara. Nunca podré agradecer todo lo que habéis hecho por mí.

Por último no puedo olvidarme de la persona que más ha tenido que aguantarme durante todo este proceso, que siempre ha tenido palabras de ánimo y un abrazo cuando lo necesitaba, solo puedo decirle a Ana una cosa: gracias por hacerme feliz.

Acabo con una cita del gran Severo Ochoa “Me he dedicado a investigar la vida y no sé por qué ni para qué”. Yo tampoco tengo la respuesta a por qué me he dedicado a la investigación, solo sé que he disfrutado el camino.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 19

1. FISIOLÓGÍA VASCULAR	21
1.1 ANATOMÍA DE LA AORTA	21
1.2 HISTOLOGÍA DE LA AORTA.....	23
2. ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL.....	24
2.1 DESARROLLO DEL AAA.....	26
2.2 EXPANSIÓN Y ROTURA DEL AAA	30
2.3 FISIOPATOLOGÍA	33
2.4 DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.....	36
2.5 MODELOS ANIMALES DE AAA	40
3. RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS	41
4. EL ESTRÉS OXIDATIVO	44
5. OXISTEROLES	46
6. AUTOFAGIA	47
6.1 MITOFAGIA.....	49
7. BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL.....	50

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 53**MATERIALES Y MÉTODOS 59**

1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PACIENTES	61
1.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	61
1.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	61
2. CULTIVOS CELULARES	62
2.1 CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS	62
2.2 TRATAMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE CML	64
3. EXPERIMENTACIÓN EN MODELOS MURINOS	64
3.1 MANIPULACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LOS ANIMALES	64
3.2 SUPERVISIÓN DEL BIENESTAR ANIMAL	65
3.3 FUNDACIÓN Y MANTENIMIENTO DE COLONIAS MURINAS.....	67
3.4 GENOTIPADO DE LOS RATONES	68
3.5 IMPLANTACIÓN DE LAS MINIBOMBAS.....	72

3.6 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DEL MODELO MURINO	72
3.7 MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN EL RATÓN POR LA TÉCNICA DEL MANGUITO EN LA COLA.....	73
3.8 SEGUIMIENTO DEL DIÁMETRO DE LA AORTA MEDIANTE ULTRASONOGRAFÍA.....	73
3.9 OBTENCIÓN DE TEJIDOS DE RATÓN	74
4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO	74
4.1 EXTRACCIÓN DE ARN	74
4.2 CUANTIFICACIÓN DEL ARN	75
4.3 PCR A TIEMPO REAL	75
5. HISTOLOGÍA BÁSICA	79
5.1 DESPARAFINADO DE LAS MUESTRAS PARA SU USO.....	79
5.2 HEMATOXILINA EOSINA.....	79
5.3 TRICRÓMICO	79
5.4 ORCEÍNA	80
5.5 ROJO SIRIO	80
6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNA.....	81
6.1 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOFUORESCENCIA	81
6.2 MEDICIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	83
6.3 ENSAYOS DE APOPTOSIS	85
6.4 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS EN CULTIVO.....	86
6.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO MURINO.....	87
6.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PROTEICA	87
6.7 WESTERN - BLOT	87
6.8 ZIMOGRFÍA	88
7. ANÁLISIS DEL PLASMA	89
7.1 BIOQUÍMICA BÁSICA	89
7.2 ANÁLISIS DE OXISTEROLES.....	89
7.3 ELISA	90
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
<u>RESULTADOS</u>	<u>93</u>
1. RESULTADOS OBTENIDOS EN MUESTRAS DE PACIENTES	95
1.1 HISTOLOGÍA BÁSICA DE LA AORTA ABDOMINAL ANEURISMÁTICA	95
1.2 LOS MARCADORES DEL ESTRÉS DEL RETÍCULO ESTÁN INDUCIDOS EN EL AAA.....	97
1.3 ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PARED AÓRTICA ABDOMINAL.....	105

1.4 ESTUDIO DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL Y DEL PROCESO DE AUTOFAGIA EN EL AAA 108

1.5 MARCADORES CIRCULANTES EN PLASMA 111

1.6 LA EXPOSICIÓN A 7-KC ACTIVA EL ESTRÉS DEL RE, EL ESTRÉS OXIDATIVO Y ALTERA LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL..... 120

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN MODELO MURINO..... 125

2.1 HISTOLOGÍA BÁSICA 125

2.2 EL DIÁMETRO AÓRTICO SE ENCUENTRA REDUCIDO EN LOS RATONES TRATADOS CON TUDCA Y PBA..... 126

2.3 EL TRATAMIENTO LOS INHIBIDORES DEL ESTRÉS DEL RE INCREMENTA LA SUPERVIVENCIA Y REDUCE LA INCIDENCIA DE FORMACIÓN DE AAA EN LOS RATONES APOE^{-/-} INFUNDIDOS CON ANG II..... 128

2.4 LA PRESIÓN SISTÓLICA ESTÁ REDUCIDA SIGNIFICATIVAMENTE EN LOS RATONES TRATADOS CON TUDCA Y PBA..... 130

2.5 ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ANIMALES QUE CONFORMAN EL ESTUDIO..... 131

2.7 LA DEFICIENCIA PARA EL GEN DDIT3 NO LIMITA LA DILATACIÓN DE LA AORTA ABDOMINAL EN EL MODELO APOE^{-/-} INFUNDIDO CON ANG II..... 138

2.8 LA DEFICIENCIA DE DDIT3 REDUCE LA PRESIÓN ARTERIAL Y LA INCIDENCIA DE FORMACIÓN DE AAA PERO NO MEJORA LA SUPERVIVENCIA DE LOS ANIMALES APOE^{-/-} INFUNDIDOS CON ANG II..... 140

2.9 LA PRESIÓN SISTÓLICA Y MEDIA SE HALLÓ REDUCIDA EN LOS RATONES APOE^{-/-} / CHOP^{-/-} 142

2.10 ANÁLISIS BIOQUÍMICO 143

DISCUSIÓN 145

CONCLUSIONES 161

BIBLIOGRAFÍA..... 165

INTRODUCCIÓN

1. Fisiología vascular

La función del sistema cardiovascular es distribuir sustancias por el organismo para abastecer a los tejidos de nutrientes u otros factores y eliminar de ellos los productos desechables de su metabolismo. El corazón actúa a modo de bomba y las arterias y venas son la red de distribución. En mamíferos la aorta es la principal arteria del cuerpo con 1.2 m de largo y aproximadamente 2.6 cm de diámetro^{1,2}.

1.1 Anatomía de la aorta

La aorta emerge desde el ventrículo izquierdo del corazón y bifurca en la zona lumbar del cuerpo en las arterias ilíacas. Se divide en 4 zonas fundamentales: aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente torácica y aorta descendente abdominal (Fig. 1). A pesar de su disposición hacia las zonas inferiores, la aorta, también irriga las zonas superiores del cuerpo a través de arterias carótidas y la arteria subclavia izquierda, ambas inician su recorrido desde el arco aórtico.

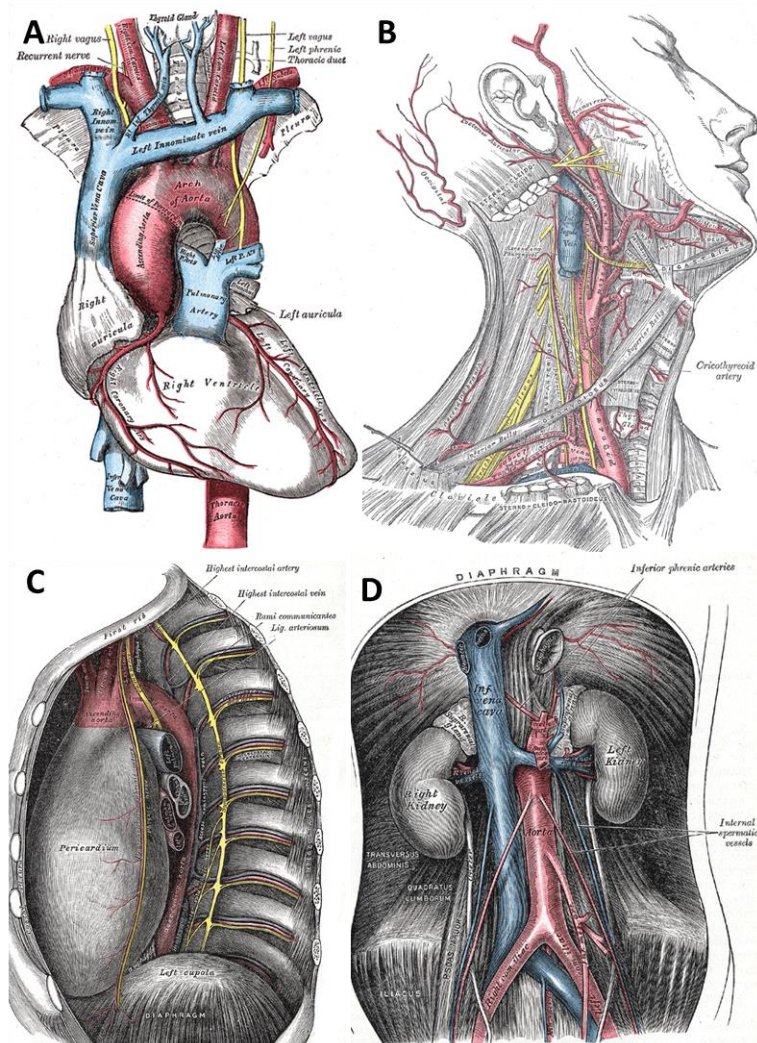


Figura 1. **Anatomía de la aorta.** A) Corazón y aorta ascendente B) Irrigación de las zonas superiores C) Aorta descendente abdominal D) Aorta descendente torácica. Adaptada de Henry Gray³.

1.2 Histología de la aorta

Las arterias se dividen en arterias elásticas, siendo la aorta su principal representante, y en arterias musculares, que en su gran mayoría derivan de la aorta. Las arterias de un calibre grande o mediano, como la aorta, están compuestas de tres capas diferentes desde el punto de vista morfológico y celular. La capa más interna, en la luz del vaso, es conocida como capa íntima, se compone de una monocapa de células endoteliales, una lámina de fibras elásticas y de una fina capa de matriz extracelular de tejido conectivo. A continuación hallamos la capa media, compuesta principalmente de células vasculares lisas y tejido elástico y colágeno, esta capa es diferente en las arterias elásticas, tales como la aorta, ya que en estas, observamos una gran cantidad de tejido elástico y también se observan capas de células vasculares lisas alternadas con láminas de elastina fenestradas. Esta capa se delimita de la capa adventicia a través de una lámina elástica. La capa más externa de todas, la capa adventicia, se halla compuesta por tejido conectivo, fibroblastos y algunas células musculares lisas, separándose de la capa media con una fina capa elástica discontinua. (Fig. 2)

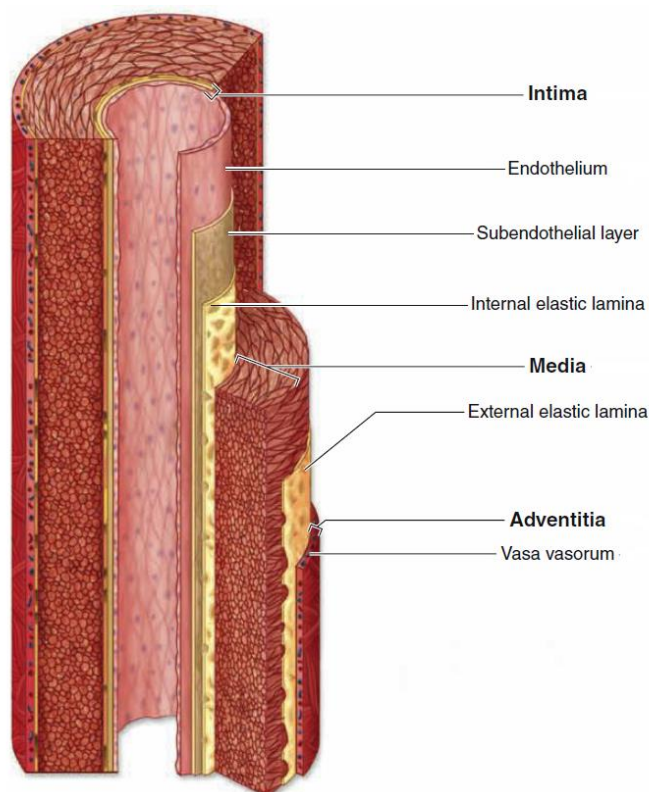


Figura 2. **Histología de la aorta.** Se indican las diferentes partes de la aorta. Adaptada de Junqueira Basic Histology⁴.

2. Aneurisma de aorta abdominal

El aneurisma de aorta abdominal es una patología vascular que consiste en una dilatación del 50% o mayor que el diámetro normal. Se desarrolla de forma progresiva, localizada y permanente debido a un debilitamiento que se produce en la pared arterial. El desarrollo del AAA se asocia a un proceso inflamatorio crónico, caracterizado por un fuerte infiltrado de células inmunes, por la degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEX), la producción de estrés oxidativo, un incremento de la neovascularización y una exacerbada

apoptosis de las células musculares lisas (CML), lo que conlleva un remodelado destructivo de la pared vascular.

En humanos afecta principalmente al segmento de la aorta abdominal infrarrenal. Por su ubicación, la aorta abdominal está expuesta a condiciones hemodinámicas que incrementan el desarrollo de esta enfermedad⁵. En esta zona es normal una ligera disminución del colágeno y la elastina⁶ y si a esto le sumamos a la pérdida de estos componentes de la matriz extracelular con la edad se explica porque la aorta abdominal sea especialmente vulnerable⁷.

En el AAA, la dilatación de la aorta llega a un punto en el que si no se interviene quirúrgicamente, puede llegar a romperse y provocar la muerte del individuo. Hoy en día el diámetro arterial es el único indicador del riesgo de rotura y la cirugía es la única terapia, todo esto conlleva un elevado riesgo de morbilidad y mortalidad en los pacientes con AAA.

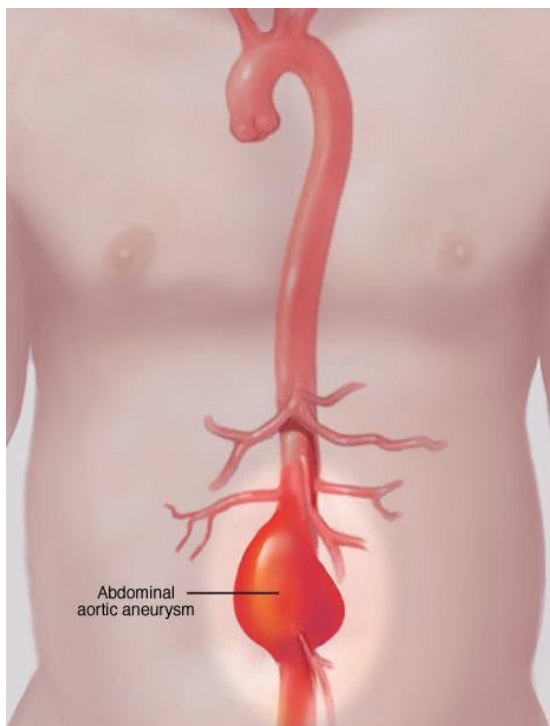


Figura 3. **Anatomía del aneurisma.** Aneurisma de aorta abdominal. Adaptado de www.mayoclinic.org

2.1 Desarrollo del AAA

2.1.1 Epidemiología

La incidencia de la enfermedad es mayor en hombres que en mujeres, con un ratio 6:1. En mujeres suele aparecer más tardíamente debido probablemente al papel protector de las hormonas sexuales femeninas⁸. El aneurisma de aorta abdominal tiene una prevalencia de hasta un 8% en la población masculina mayor de 65 años. Además, en las sociedades occidentales se ha observado un incremento en la incidencia de la enfermedad en las últimas décadas en paralelo con el envejecimiento poblacional^{1,9}. Estudios más recientes muestran que en los últimos 20 años la epidemiología ha cambiado con la introducción de la cirugía endovascular, programas nacionales de

seguimiento del diámetro aórtico en países como Suecia, Reino Unido o Estados Unidos junto con el cambio de uno de los mayores factores de riesgo: el tabaquismo. Todos estos factores han hecho que la mortalidad disminuya tras una intervención tanto si no ha sufrido ruptura como si la ha sufrido tanto a corto como a largo plazo¹⁰. Esto también ha contribuido a la disminución de la incidencia y del tamaño del diámetro aórtico^{11,12}.

2.1.2 Factores de riesgo para el desarrollo del AAA

Los principales factores de riesgo asociados a AAA son la edad, el sexo, el tabaquismo, el grupo poblacional, la historia familiar, la presencia de otros aneurismas, hipertensión y aterosclerosis. La incidencia y la prevalencia no son significativas en menores de 60 años y en varones entre 65 y 80 años la prevalencia es de entre un 4 y un 8%¹³⁻¹⁶. La incidencia en mujeres en el mismo rango de edad es entre 4 y 6 veces menor comparado con los hombres¹³. A pesar de estos datos la auténtica prevalencia en mujeres puede estar subestimada ya que la mayoría de estudios definen aneurisma como diámetro mayor a 3 cm y esto no tiene en cuenta el menor tamaño de basal de la aorta en mujeres¹⁷. A pesar de todo al ser el tabaquismo uno de los mayores factores de riesgo del AAA, y que el porcentaje de población femenina fumadora está aumentando se espera un cambio en las ratios de incidencia entre géneros en un futuro¹⁸.

El tabaquismo es el principal factor de riesgo modificable, alrededor de un 18 a 25% de los pacientes aneurismáticos son fumadores¹⁹⁻²¹. Al mismo tiempo los fumadores suelen presentar, inicialmente, aneurismas más grandes. Esto se da probablemente por la acción inhibitoria de la α -1-antitripsina, un inhibidor de la elastasa²². Existe una asociación entre el número de paquetes - año con el incremento de hallar un AAA^{20,21}. El cese en el tabaquismo baja las probabilidades

de sufrir AAA, siendo mayor el beneficio en aquellos sujetos que dejaron el hábito de fumar hace diez o más años. A pesar de abandonar el hábito la probabilidad de sufrir la enfermedad sigue existiendo, lo que indica un daño irreversible a causa del tabaco²⁰.

El AAA ocurre más frecuentemente entre poblaciones caucásicas, la incidencia baja 10 veces entre las poblaciones asiáticas²³ y se reduce a la mitad en el caso de poblaciones de origen afroamericano respecto a la población caucásica¹⁹.

Tampoco se puede ignorar la predisposición genética como factor de riesgo. Desde que se reportó el caso de tres hermanos donde los tres sufrieron una cirugía por rotura de AAA, se ha sospechado que existe un componente genético²⁴. Un estudio de 313 linajes mostro un aumento de ruptura de 4 veces en casos familiares comparado con casos esporádicos y, adicionalmente la edad en la que se producía una ruptura bajaba significativamente (65 años vs. 75 años)²⁵. Diversos estudios con gemelos también resaltan su importancia^{26,27} y demuestran que la probabilidad de que un gemelo monocigótico desarrolle AAA si su hermano lo ha desarrollado es de un 24%²⁸. La importancia genética parece recaer en la acumulación de genes implicados en la regulación de la inflamación o proteasas, más que en una mutación puntual. Aunque no podemos obviar síndromes monogénicos como el síndrome de Marfan o el síndrome de Ehlers-Danlos, habría que matizar que, generalmente, estos síndromes desarrollan aneurismas aórticos toracoabdominales²⁹.

En los pacientes con aneurismas en otros vasos mayores, como las arterias ilíacas, femorales o carótidas, aumenta el riesgo de padecer AAA. Los pacientes con aneurisma en arteria femoral tienen un AAA concomitante en un 85% de las veces^{30,31}. Hasta un 25% de los

pacientes tienen una combinación de AAA y aneurisma toracoabdominal^{32,33}. En comparación con los hombres, las mujeres suelen sufrir más aneurismas combinados (48% frente un 28%)³².

Tradicionalmente se ha considerado que el AAA pudiera ser una consecuencia de la arteriosclerosis; sin embargo, su etiopatogenia es más compleja. A menudo la aterosclerosis está presente en el AAA corroborando que los factores de riesgo de ambas enfermedades se solapan^{19,21,34}, sin embargo, gran parte de los pacientes que presentan una aterosclerosis avanzada en el lecho vascular no llegan a desarrollar aneurisma³⁵.

Otros factores como la obesidad, parecen tener cierta inconsistencia al relacionarse con la formación de AAA³⁶⁻³⁸. La obesidad parece ser un factor de riesgo que cobra más importancia al combinarse con la enfermedad aterosclerótica ya que en este caso dobla las probabilidades de sufrir AAA en comparación con pacientes no obesos³⁸. También se ha descrito en la literatura científica la posible relación entre el AAA y la dieta y el consumo de alcohol aunque la información respecto al consumo moderado de alcohol es inconsistente y necesita de más estudios para confirmar esta relación. A pesar de esto diversos estudios apuntan a un posible efecto protector del consumo moderado de alcohol³⁹ y, por el contrario, un efecto perjudicial cuando hay un consumo excesivo⁴⁰. En cuanto a la dieta, el consumo de fruta y vegetales parece estar asociado débilmente con una menor incidencia de AAA^{21,39}. En una cohorte sueca de más de 80.000 participantes, el alto consumo de frutas se asoció con un 25% menos de riesgo de desarrollar AAA frente aquellos individuos que ingerían menos cantidad de fruta³⁹.

La diabetes mellitus se asocia de forma positiva con la presencia de aterosclerosis pero de forma negativa con el AAA^{19,21,41-44}. Esto parece indicar que aterosclerosis y AAA, a pesar de compartir factores de riesgo, se desarrollan por mecanismos etiopatogénicos diferentes.

2.2 Expansión y rotura del AAA

Los factores de riesgo asociados con la expansión y rotura del AAA se solapan con los asociados con el desarrollo del AAA, a pesar de esto, existen algunas diferencias significativas.

2.2.1 Epidemiología

En estudios realizados en 2013 por el Centro de Control de las Enfermedades y Prevención de los Estados Unidos⁴⁵ halló que el AAA es la 15ª causa de muerte en adultos estadounidenses entre 60 y 64 años⁴⁵, esto representa un ratio de 4,1 muerte por cada 100000 personas. Como causa de muerte afecta más a hombres que a mujeres con un porcentaje de 0.13% para hombres y 0.07% para mujeres. Estudios más recientes estiman que es la 10ª causa de muerte global, siendo responsable de alrededor de un 2% de todas las muertes. La mortalidad global para pacientes con ruptura de aneurisma de aorta abdominal es entre el 65 – 85 % y la mitad de las muertes atribuidas ocurren antes de que el paciente llegue a la sala de cirugía¹⁸.

2.2.2 Factores de riesgo para la expansión y rotura del AAA

Los principales factores de riesgo asociados a expansión y rotura del AAA son el diámetro aórtico, la rapidez de expansión, tabaquismo, hipertensión, pico máximo de estrés de pared aórtica, trasplante cardíaco o renal, disminución del volumen espiratorio forzado por segundo (FEV1) y el sexo².

El diámetro aórtico es el parámetro más utilizado y asociado con la rotura del AAA siendo el porcentaje de riesgo de rotura en 12 meses el siguiente²:

- <1% de riesgo si el diámetro se halla entre 3 y 3,9 cm
- 1% de riesgo si el diámetro se halla entre 4 y 4,9 cm
- 1 a 11% de riesgo si el diámetro se halla entre 5 y 5,9 cm
- 10 a 22% de riesgo si el diámetro se halla entre 6 y 6,9 cm
- 30 a 33% de riesgo si el diámetro es > 7 cm

Mientras que la expansión del aneurisma es predecible, algunos de estos aneurismas pueden expandirse de forma más rápida de lo habitual. Se ha descrito que a mayor diámetro más rápida es la expansión^{1,46,47}. En un ensayo del Reino Unido las medias de expansión obtenidas se muestran a continuación¹:

- 1,9 mm / año para diámetros de aneurisma de 2,8 a 3,9 cm
- 2,7 mm / año para diámetros de aneurisma de 4 a 4,5 cm
- 3.5 mm / año para diámetros de aneurisma de 4,6 a 8,5 cm

La expansión rápida se ha definido como un aneurisma que crece a más de 5 mm en seis meses (10 mm / año). A pesar de esta definición inicial muchos estudios han mostrado que la definición de expansión rápida depende también del diámetro inicial del aneurisma⁴⁸.

El tabaquismo no sólo se asocia con el desarrollo del AAA sino que también lo hace con su expansión y rotura. El abandono del tabaquismo es el medio no quirúrgico más efectivo para reducir el riesgo de complicaciones del aneurisma o la muerte por ello⁴⁹. Varios estudios sugieren que mantener el hábito del tabaquismo incrementa la dilatación aórtica en 0.35 mm / año y dobla las probabilidades de sufrir una rotura⁵⁰.

Los datos respecto a la hipertensión son inconsistentes. La presión diastólica elevada se asocia con un incremento en el diámetro del

aneurisma de 0.02 cm / año por cada 10 mmHg según el grupo de estudio para la detección y manejo del aneurisma (ADAM)⁴⁶. Por otro lado estudios desde el Reino Unido fallaron en mostrar una asociación entre hipertensión y dilatación del AAA^{1,51} pero asociaron hipertensión con rotura^{52,53}. En general los estudios más consistentes parecen dar soporte a la asociación entre rotura de AAA e hipertensión pero la asociación entre la expansión del AAA y la hipertensión está menos clara.

El diámetro aórtico no siempre se puede utilizar para predecir el riesgo de rotura⁵⁴. En una revisión de estudios post-mortem, el 40% de los AAA entre 7 y 10 cm no estaban rotos. Es más, el 13% de los aneurismas inferiores a 5 cm presentaban una rotura. Estos datos conllevaron la búsqueda de otros factores asociados con la rotura del AAA. En la actualidad se dispone de varias herramientas basadas en el diagnóstico por imagen (ultrasonografía, tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética nuclear) para la detección y el seguimiento de la dilatación y expansión del AAA^{55,56}. Uno de los métodos más utilizados es la modelización tridimensional computarizada por análisis de elementos finitos a partir de los registros de TC, este método proporciona información sobre las propiedades estructurales de la pared aórtica, definiéndose como un predictor más fiable del riesgo de ruptura que el diámetro aórtico⁵⁷. Esta técnica se está refinando cada vez más y tiene en cuenta múltiples parámetros⁵⁸⁻⁶⁰. A pesar de ser prometedora se necesita más investigación en esta área, y de momento esta tecnología no está disponible para uso generalizado.

El trasplante cardíaco y de órganos abdominales parece incrementar la prevalencia de AAA, la probabilidad de expansión y el riesgo de rotura post-trasplante^{61,62}. De la misma forma los inmunosupresores y

corticosteroides asociados al tratamiento post-trasplante también se hallan asociados al desarrollo, expansión y rotura en modelos animales. A pesar de estos datos se necesitan estudios adicionales para esclarecer qué mecanismos están implicados en el desarrollo, expansión y rotura del AAA después de un trasplante^{61,62}.

Estudios individuales sugieren que pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) podrían tener un alto riesgo de rotura de AAA^{51,52,63} aunque aún no está claro todavía si esta asociación es débil o moderada.

A pesar de que la prevalencia del AAA es menor entre mujeres, múltiples estudios han mostrado que el género femenino es un fuerte predictor de rotura de aneurisma^{2,52,64,65}. Los datos obtenidos sobre un estudio realizado en Reino Unido sugirieron que el riesgo de muerte por rotura en mujeres es 4 veces superior comparado con hombres con diámetro similar⁵² y estudios más recientes confirman esta tendencia^{66,67}.

2.3 Fisiopatología

El AAA es una enfermedad compleja que implica varios procesos como la degradación de proteasas, degradación de elastinas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la infiltración de células inflamatorias, la estimulación de la apoptosis y una inflamación transmural que conlleva, finalmente, a un remodelado de la pared aórtica⁶⁸. El desarrollo de la enfermedad implica una respuesta inflamatoria local que conlleva la infiltración de macrófagos, neutrófilos, mastocitos y linfocitos, siendo la respuesta que generan retroalimentada por las proteasas y las citoquinas que secretan. El resultado es la muerte celular programada de las células musculares lisas de la pared aórtica y una degradación de la matriz extracelular.

Así pues existen tres procesos que dan lugar al desarrollo de la enfermedad: la proteólisis, la inflamación y la apoptosis. Estos procesos son los responsables de la pérdida de elasticidad y resistencia de la pared aórtica, impidiendo la recuperación del diámetro normal tras cada bombeo cardiaco^{69,70}.

El AAA se inicia con un proceso de degradación de tejido conectivo por parte de las metaloproteinasas, aunque también se han descrito la implicación de otras enzimas como las activadoras de plasminógeno, las serinas elastasas y la catepsina⁷¹. La actividad de estas enzimas en la capa media de la aorta provoca que pierda su estructura y propiedades elásticas dando lugar a su dilatación.

A continuación la pared sufre una infiltración masiva de células del sistema inmune. Se desconoce la razón por la cual la inflamación se produce, pero se especula que péptidos solubles derivados de la degradación de componentes de la matriz extracelular, como son la elastina, la laminina o la fibronectina, sean los causantes, actuando como elementos quimiotácticos para macrófagos⁷². Tampoco está establecido cómo se inicia la captación de leucocitos pero probablemente esté dirigido por niveles elevados de IL-8 y MCP-1 en el AAA^{56,73-75}.

El tejido aneurismático produce prostaglandina E2, TNF- α , IL-1 β e IL-6. La activación de la cascada de citoquinas aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular y el incremento de la degradación de la matriz extracelular⁷³. TNF- α e INF γ parecen ser las citoquinas con el incremento más acusado en pacientes con AAA de dimensiones considerables⁷⁶.

La reducción del contenido de células musculares lisas en la capa media de la aorta por apoptosis^{77,78} provoca un debilitamiento de la pared arterial. Existe una opinión consensuada en que la aorta se dilata por la pérdida de elastina, pero la pared arterial se engruesa como resultado de depósitos de colágeno tratando de compensar el daño sufrido⁷⁹. Este contenido se va incrementando a medida que el diámetro del aneurisma también aumenta^{80,81}. El colágeno que se va depositando es principalmente tipo I y III⁸². Este colágeno no es maduro, lo que provoca una arteria más distensible.

Esta desestructuración de la capa media provoca que la presión recaiga sobre la capa adventicia, generando una respuesta inmunológica inflamatoria, fibróticas y angiogénicas⁸³, empeorando drásticamente el aneurisma. Se ha observado una gran correlación entre la formación de nuevos capilares, la degradación de fibras elásticas y la medida del infiltrado de leucocitos en la cara externa de la pared arterial de los enfermos de AAA, zonas de elevado riesgo de rotura⁸⁴.

En la actualidad la noción del trombo intraluminal que se forma en el 75% de los casos de AAA ha cobrado importancia⁸⁵. Este trombo es un tejido de nueva creación biológicamente activo formado por múltiples capas de fibrina coagulada. La cara luminal es una capa hemática con fibras de fibrina, mientras que, en la cara contraria encontramos fibrinólisis activa. El grosor de este trombo disminuye la biodisponibilidad de oxígeno en la pared arterial⁸⁶, hecho que puede estar relacionado con la reactividad de los macrófagos y su producción de elastasa⁸⁷.

Todos estos cambios provocan un incremento gradual del diámetro aórtico y del estrés hemodinámico⁸⁸. El aneurisma se puede expandir,

diseccionar o romper cuando la tensión hemodinámica es muy elevada. Turbulencias en el flujo también contribuye al crecimiento del aneurisma pues causan daño al endotelio y aceleran la degeneración de la pared arterial. La gran mayoría de AAA son asintomáticos hasta el momento de la rotura. Estudios experimentales con modelos murinos de AAA demuestran que el tratamiento de arteria con elastasa conduce a la dilatación arterial mientras que el tratamiento con colagenasa conduce a la rotura arterial sin dilatación. Así se sugiere que la degradación de elastina es un paso clave en el desarrollo de la enfermedad, pero que la consecuencia final de rotura viene dada por la degradación de colágeno⁸⁹. Con estos datos es muy probable que una rotura de AAA tenga unos niveles proteasas elevados, junto con un número incrementado de leucocitos y neovascularización del tejido aneurismático⁹⁰⁻⁹².

2.4 Diagnóstico y tratamiento

Una de las características del AAA es que en general es una enfermedad asintomática. Suele diagnosticarse de forma casual durante exploraciones abdominales para el estudio de otras patologías. A pesar de que la falta de sintomatología se da en la mayoría de pacientes con AAA en algunos casos si se presentan manifestaciones clínicas aunque siempre inespecíficas y sutiles. Algunos ejemplos de estas son edema en los miembros inferiores, dolor lumbar o abdominal y pérdida de peso⁹³.

En caso de no intervenir un AAA se corre el riesgo de que se rompa tras una dilatación progresiva⁹¹ siendo la rotura la mayor consecuencia clínica que se asocia con una mortalidad del 90%⁹⁴. Existen diversos criterios para definir el AAA^{47,95}, pero es aceptado que existe un aneurisma cuando el diámetro aórtico está incrementado un 50% respecto al diámetro normal⁹⁶. En la actualidad

el diámetro aórtico es el único marcador de progresión de la enfermedad y de su complicación más grave, la rotura.

Actualmente existen varias técnicas para el seguimiento del diámetro aórtico:

- Ecografía (Ultrasonografía): Un método no invasivo que permite medir el diámetro aórtico y observar el trombo intraluminal, se trata de un método con una alta sensibilidad en torno un 92 - 99 % y una especificidad del 100%⁹³. A pesar de tener limitaciones en casos concretos, es el método exploratorio de elección para el AAA⁹⁷.
- Tomografía computarizada con contraste: Esta técnica ofrece imágenes de alta resolución y permite una exploración detallada de toda la anatomía, como las características inflamatorias, calcificantes, trombo o señales de rotura. Los vasos viscerales y pequeñas variaciones anatómicas también son halladas con este método. A pesar de ser un método muy fiable y preciso tiene ciertos inconvenientes como la irradiación y la utilización de contraste. A pesar de ello es el método diagnóstico utilizado para el preoperatorio⁹⁷.
- Resonancia magnética con contraste: Con unas características muy similares a la tomografía computarizada con contraste pero sin nefrotoxicidad o radiaciones ionizantes. Puede sobrestimar el grado de estenosis, no detecta calcificación y presenta varios artefactos en portadores de dispositivos metálicos. Es el método indicado en caso de no ser posible realizar la tomografía computarizada⁹⁸.



Figura 4. **Técnicas de seguimiento del diámetro aórtico.** A) Ultrasonografía de un aneurisma abdominal B) Tomografía computarizada indicando el lumen (flecha delgada) y el trombo (flecha gruesa). Adaptada de Crawford 2003⁹⁹.

El tamaño del aneurisma es un factor reconocido para la predicción de ruptura, Tras un seguimiento se aconseja una intervención quirúrgica cuando el diámetro es superior a 5,5 cm. La gran controversia proviene de cómo manejar los aneurismas más pequeños, un seguimiento riguroso de aneurismas inferiores de 5,5 cm es seguro, mientras que una intervención temprana no se asocia con una mejora en la supervivencia a largo plazo¹⁸. La única medida para reducir el riesgo de rotura es la intervención quirúrgica⁹¹. Existen dos intervenciones posibles para el AAA, la cirugía de reparación endovascular, que consiste en acceder a la aorta mediante una pequeña incisión desde la femoral y colocar un stent, y la cirugía abierta de reparación, que consiste en una gran incisión desde debajo del abdomen hasta debajo del ombligo y se sustituye la aorta dañada por una pieza sintética^{100,101}. Debido a la ausencia de fármacos para tratar el AAA, la mejora del conocimiento sobre los mecanismos implicados en todas las etapas de la enfermedad es clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas que prevengan, o frenen, la patología.

Para luchar contra la progresión del AAA, la única herramienta es regular los factores de riesgo. Las estatinas para el control de la hiperlipidemia y un control de la hipertensión arterial limita la progresión del aneurisma en modelos animales en un 25% y la incidencia en un 30%^{102,103}. Diversos autores defienden el uso de estatinas como fármaco beneficioso para reducir la progresión del AAA en humanos¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. Se cree que el uso de estatinas repercute de forma positiva de forma general en todo el sistema cardiovascular, aunque ningún estudio ha sido todavía concluyente.

Los estudios centrados en la limitación de los procesos inflamatorios subyacentes en la patología mediante el uso de antiinflamatorios no esteroideos, muestran una reducción en el crecimiento anual de aneurisma en el caso de pacientes con AAA de pequeñas dimensiones¹⁰⁸ y, en el caso de pacientes con aneurisma más avanzado, parecen reducir el riesgo de rotura¹⁰⁹. Sin embargo, otros estudios presentan resultados contradictorios^{110,111}.

En modelos preclínicos la doxiciclina, una tetraciclina, puede inhibir directamente la actividad metaloproteínasa¹¹². En estudios clínicos, los tratamientos con doxiciclina reducen el contenido de neutrófilos en la pared de la aorta y disminuye los niveles de proteína MMP9 y su actividad¹¹³⁻¹¹⁵. A pesar de tener estos efectos todavía se tienen serias dudas sobre la funcionalidad de este fármaco ya que no se observan beneficios claros sobre la progresión del tamaño del AAA¹¹⁶.

Otros tratamientos como la aspirina, un antiplaquetario, han demostrado en modelos animales una disminución de la formación del trombo intraluminal¹¹⁷. Este proceso puede darse por dos vías, o bien por efecto antioxidante o bien por reducción de radicales libres^{118,119}. En la actualidad, los pacientes diagnosticados con AAA suelen iniciar

tratamientos con aspirina porque se ha asociado con una reducción de las muertes vasculares, a pesar de esto la aspirina tiene un valor incierto ya que a pesar de reducir los eventos oclusivos de las enfermedades vasculares cualquier aumento hemorrágico debe sopesarse cuidadosamente^{98,120}.

Al no existir terapias farmacológicas que limiten la progresión o que permitan revertir el daño arterial que sufren los pacientes con AAA, es fundamental identificar nuevos marcadores de evolución y la búsqueda de nuevas dianas farmacológicas para poder tratar esta patología en el futuro.

2.5 Modelos animales de AAA

El estudio con animales de experimentación surge de la necesidad de conocer y entender la fisiopatología del AAA. Existen dos aproximaciones para simular el AAA en modelos animales, la cirugía o el tratamiento farmacológico. En la literatura científica se han descrito una serie de modelos animales de AAA, desde ratones y ratas hasta grandes animales, como cerdos^{121,122}. La búsqueda de un nuevo y mejor modelo animal es evidente ya que incluso el pez cebra se ha utilizado recientemente por primera vez en la investigación del AAA¹²³. A pesar de esto, el ratón sigue siendo el modelo animal más utilizado para el estudio del AAA siendo tres los métodos principales que generan la enfermedad: la perfusión con elastasa, la inducción con cloruro de calcio (CaCl₂) y la infusión con Ang II en el ratón deficiente en Apolipoproteína E.

La inducción experimental del AAA utilizando una perfusión intraluminal con elastasa pancreática porcina (EPP) se desarrolló por primera vez, utilizando un modelo canino, en la década de los '60^{124,125}. Desde este descubrimiento, el método se ha utilizado

ampliamente en diferentes especies animales y sufriendo diversas variaciones^{126,127}. A pesar de esto hay discrepancias en los ratios de desarrollo de AAA con la perfusión de EPP¹²⁸.

La inducción por CaCl_2 apareció a finales de los años '80 en un modelo de conejo¹²⁹. Inicialmente este estudio fue sobre arteria carótida pero más tarde fue utilizado en AAA¹³⁰, finalmente se demostró que aplicaciones peri-aórticas de CaCl_2 induce AAA¹³¹. La exposición de CaCl_2 provoca una destrucción de las fibras de elastina de la pared aórtica y la infiltración de células inflamatorias entre 3 y 7 días después de la inducción.

La infusión por Ang II fue descrita por primera vez en el año 2000 en un modelo murino deficiente para ApoE^{-/-}¹³². Este modelo presenta ciertos inconvenientes como la necesidad de minibombas osmóticas para la infusión sistémica continua de la Ang II y que los animales tienden a generar aneurismas suprarrenales. Al infundir con Ang II ratones con genotipo silvestre C57BL/6, la formación de AAA se produce en un 39% de casos. Pero en ratones ApoE^{-/-} o LDLR^{-/-} los animales desarrollan AAA en casi el 100% de los casos. El modelo Ang II se basa en la simulación del proceso inflamatorio¹³². Este modelo no necesita de una gran cirugía, pero la inducción de AAA por este método conlleva a menudo la muerte del animal por rotura de la aorta en un 20-25 % de los animales. A pesar de sus inconvenientes este modelo está siendo utilizado ampliamente dada su alta reproducibilidad¹³³⁻¹³⁵.

3. Respuesta a proteínas mal plegadas

Se ha demostrado que el estrés del retículo endoplasmático y la apoptosis de células musculares lisas se hallan aumentados en aneurismas de aorta torácica humana y en modelos murinos¹⁰⁷.

Factores como la isquemia, la hipoxia, el estrés oxidativo, el envejecimiento y factores genéticos pueden alterar la función del retículo endoplasmático. Esto provoca una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo, denominado estrés del retículo endoplasmático¹³⁶. En respuesta a este estrés se dispara la denominada respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolding protein response* o UPR) compuesta por 3 vías de cascadas de señalización iniciadas con la activación de tres proteínas sensoras de diferente índole: la enzima IRE1 o *inositol requiring enzyme 1*, la proteína quinasa PERK o y el factor de transcripción de activación 6 o ATF6.

PERK, IRE1 y ATF6 tienen funciones citosólicas diferentes asociadas con la habilidad de activar sus respectivos transductores de señal (respectivamente, factor de transcripción de activación 4 (ATF4), *x-binding protein 1* activado (sXBP1) y ATF6 activado). Cada una de estas vías tiene una función asociada, de esta manera, la vía PERK, a través de la fosforilación de eIF2 α , inhibe la traducción proteica. ATF4 en la inducción de varios genes relacionados con autofagia y, dependiendo del nivel del estímulo, puede activar apoptosis en colaboración con la proteína CHOP. XBP1 activado induce la expresión de chaperonas y la degradación de proteínas ligada a estrés del retículo endoplasmático (ERAD). Finalmente, ATF6 se transloca al aparato de Golgi donde es activado y pasa a regular genes como CHOP y componentes del ERAD.

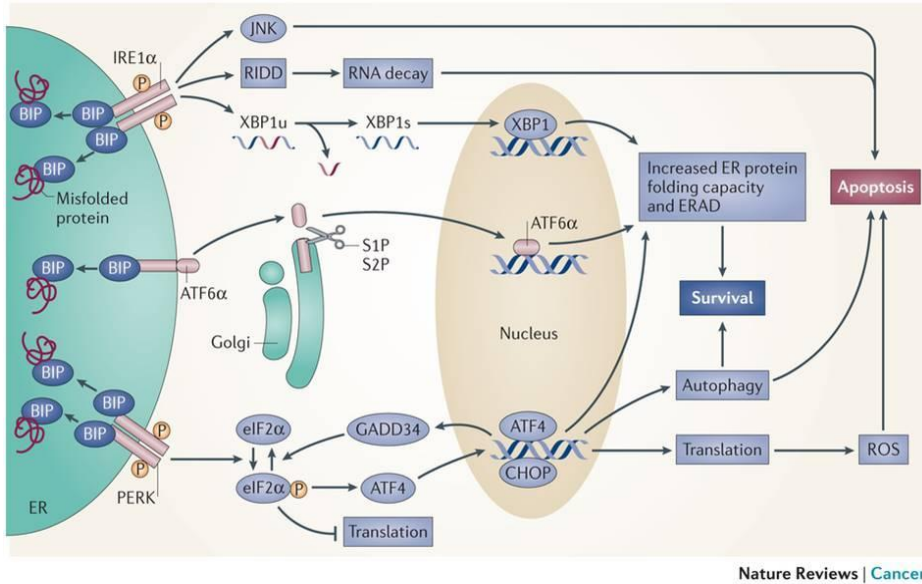


Figura 5. Conexión entre estrés oxidativo y UPR. Esquema de las vías que unen la respuesta a proteínas mal plegadas con la respuesta apoptótica del estrés oxidativo¹³⁷.

El UPR se halla muy regulado y se ha observado que una señal prolongada provoca la muerte celular mientras que una señal corta o moderada ayuda a restablecer la homeostasis celular. En la situación de un estrés prolongado, si la situación no se resuelve, ocurre la apoptosis celular. Esto conlleva a disfunciones celulares y tisulares. Una desregulación de las vías del UPR pueden desencadenar diversas enfermedades tales como diabetes, inflamación, neurodegeneración o contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares^{138–141}. Varios autores han reportado la suma importancia que juega el estrés del retículo endoplasmático en la patogenicidad de la hipertensión, aterosclerosis, fallo cardíaco y otras enfermedades cardiovasculares^{142,143}.

Estudios recientes sugieren la existencia de una estructura comunicativa entre la mitocondria y el retículo endoplasmático¹⁴⁴. La

UPR se halla ligada especialmente al estrés mitocondrial pero también al estrés oxidativo y a procesos de autofagia^{145,146}.

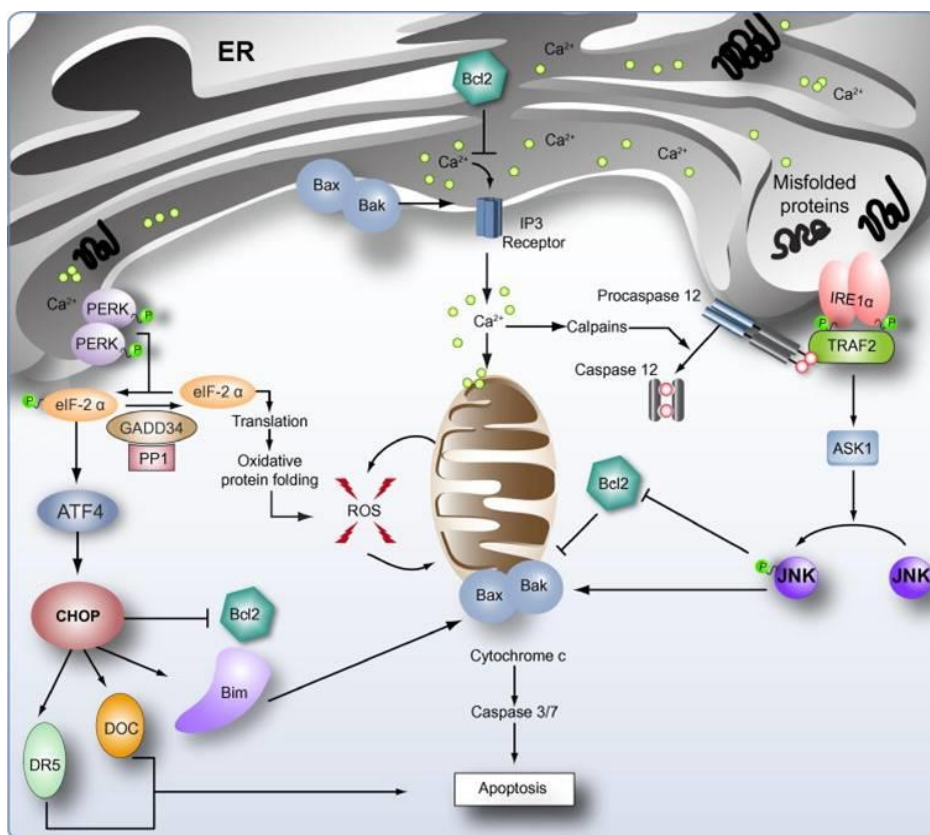


Figura 6. **Conexión entre el estrés del RE y el estrés oxidativo.** Esquema de las vías que conectan la respuesta a proteínas mal plegadas con la respuesta apoptótica dependiente de mitocondria y asociada con el estrés oxidativo (Harmeet M 2011).

4. El estrés oxidativo

Las ERO son moléculas que derivan del oxígeno con una gran capacidad de reacción con otras moléculas. Las ERO más habituales en los tejidos, son el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el anión superóxido, siendo este último precursor de muchas otras especies oxidativas.

Suelen aparecer con especies reactivas de nitrógeno (RNS), como el NO y derivados como el peroxinitrito, que suelen acompañar a los ERO en las reacciones de oxidación - reducción.

En condiciones normales, los niveles de ERO se mantienen dentro de unos niveles fisiológicos, donde actúan como señalizadores, regulan el tono vascular, la detección de oxígeno, la proliferación, la apoptosis y las respuestas inflamatorias, entre otras funciones. En una situación de estrés, la generación de ERO se exagera generando estrés oxidativo, que puede ocasionar daños celulares debido a interacciones con el ADN, proteínas o lípidos.

Actualmente el estrés oxidativo se define como una pérdida del equilibrio entre los agentes oxidantes y los antioxidantes en favor de los primeros, que potencialmente pueden causar daño celular. En la actualidad se sabe que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades como el cáncer, la diabetes, enfermedades neurodegenerativas, la artritis reumatoide, el envejecimiento y enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión o el aneurisma de aorta abdominal¹⁴⁷⁻
149.

La generación de ERO ocurre a nivel de la mitocondria, el citosol, la membrana plasmática o el espacio extracelular por acción de diferentes enzimas. En la pared vascular destaca el papel de la NADPH oxidasas, la xantina oxidasa, las enzimas de la cadena respiratoria, el sistema eNOS y las lipoxigenasas¹⁵⁰. La reacción que llevan a cabo es la de reducción del O₂ a anión superóxido utilizando NADPH como donador de electrones. Se forman complejos enzimáticos unidos a membrana con múltiples subunidades para

ejercer su función, entre estas las enzimas Nox que tienen una función catalítica. Nox presenta diversas isoformas, siendo las más importantes a nivel cardiovascular la Nox1, Nox2 y Nox4. Por otra parte la xantina oxidasa se cree que puede ser una fuente adicional de anión superóxido a partir del O₂ en el vaso. Diversos estímulos la pueden activar como la hipoxia, la reoxigenación, citoquinas, el estrés de pared o las lesiones vasculares¹⁵¹. La mitocondria es una gran generadora de estrés oxidativo debido al flujo de electrones en la cadena respiratoria, donde una parte del oxígeno se convierte en anión superóxido, siendo esta fuente asociada a aterosclerosis¹⁵². Por otro lado el sistema eNOS es el responsable de la reacción de producción de NO desde L-arginina. En diversas patologías como la hipercolesterolemia o la hipertensión¹⁵³, el desacoplamiento de la eNOS puede generar anión superóxido en lugar de NO. Finalmente las lipoxigenasas catalizan la inserción de oxígeno en cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, las lipoxigenasas y sus productos generan ERO y están involucradas en aterosclerosis^{154,155}.

Debido a los múltiples efectos perjudiciales que puede tener un incremento en las ERO, las células han desarrollado una serie de medidas para defenderse. En la pared vascular los sistemas detoxificantes destacados con la superóxido dismutasa (SOD), la catalas, glutatión peroxidasa y la paraoxonasa. La principal defensa contra el anión superóxido y el peroxinitrito son las enzimas de la familia SOD, dismutando el anión superóxido a H₂O₂ y oxígeno molecular.

5. Oxisteroles

Los oxisteroles son productos enzimáticos derivados del colesterol resultante de su oxidación y en cuya estructura siempre aparecen grupos funcionales tales como hidroxilo, ceto o hidroperoxi. Estos

grupos se unen a la estructura en anillo o la cadena unida a este¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Estas moléculas participan en diversos procesos biológicos como la homeostasis, el metabolismo del colesterol, la apoptosis o la autofagia^{156,157,159}. Diversos estudios han asociado los oxisteroles con enfermedades relacionadas con la edad como las enfermedades cardiovasculares, ciertas enfermedades neurodegenerativas o cáncer^{156,157,160-162}.

Los oxisteroles 24-S-Hidroxicolesterol y 27-Hidroxicolesterol son agonistas endógenos para el receptor de hígado X (LXR), un receptor nuclear involucrado en regulación metabólica y procesos inmunitarios. Por otro lado, los oxisteroles 7 α -Hidroxicolesterol y 7-Cetocolesterol (7-KC) estimulan la respuesta inflamatoria en células endoteliales¹⁶². Finalmente, el 7 β -Hidroxicolesterol es un inhibidor de la hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, de esta forma 7 β -Hidroxicolesterol actúa reduciendo los niveles de lípidos, colesterol y triglicéridos de la sangre.

Recientemente, 7-KC se ha descrito como un potente activador del estrés del RE en células vasculares¹³⁸. Su incremento en los niveles circulantes en pacientes refleja un elevado número de colesterol libre junto con un incremento en el estrés oxidativo. El 7-KC interviene activamente en la oxidación de lipoproteínas induciendo autofagia y apoptosis en placas ateroscleróticas avanzadas, las cuales son comunes en pacientes con AAA¹⁴⁵.

6. Autofagia

La investigación de la autofagia empezó en la década de los 90 donde se identificó en levaduras los genes implicados en este proceso en diversos trabajos¹⁶³. Los trabajos en este campo le valieron a Yoshinori Ohsumi el premio Nobel de Medicina en 2016¹⁶³⁻¹⁶⁶.

La autofagia es un proceso catabólico en el cual se secuestran en vesículas de doble membrana todo tipo de orgánulos o vacuolas. Estas vacuolas son liberadas dentro del lisosoma, donde son degradados por enzimas hidrolíticas, y posteriormente se reciclan. Este proceso juega un papel esencial en la adaptación al ayuno y a las condiciones ambientales cambiantes, a la remodelación celular durante el desarrollo y acumulación de orgánulos alterados que generan ERO en las células durante el proceso de envejecimiento. Estudios recientes indican que es un proceso implicado en la muerte celular y es conocido por ello como muerte de tipo II¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

A pesar de que la mayoría de estudios sobre autofagia en el sistema cardiovascular se centran en el corazón, la autofagia se ha relacionado recientemente con la regulación de la homeostasis celular en células vasculares^{170,171}. Estudios como el de Torisu y col¹⁷² muestran como la autofagia puede ser un regulador de la formación del trombo mediante el control de la secreción del factor de von Willebrand en la células endoteliales.

En CML la autofagia se ha descrito como determinante en la respuesta a estrés celular ya que inducen autofagia a través de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)¹⁷³. Por otro lado, la autofagia tiene un papel protector en el proceso de calcificación de las CML, un proceso habitual en pacientes con AAA, el proceso de autofagia actúa regulando la apoptosis y la MEX aumentando la recambio celular de células de la adhesión y la vía intrínseca de señalización mediada por integrinas^{174,175}.

La autofagia en el AAA no ha sido suficientemente estudiada, a pesar de esto se ha descrito que la expresión de LC3-I/-II, Atg4b, Beclin1,

Bnip3 y Vps34 son reguladas al alza en tejido aneurismático comparado con controles¹⁷⁶.

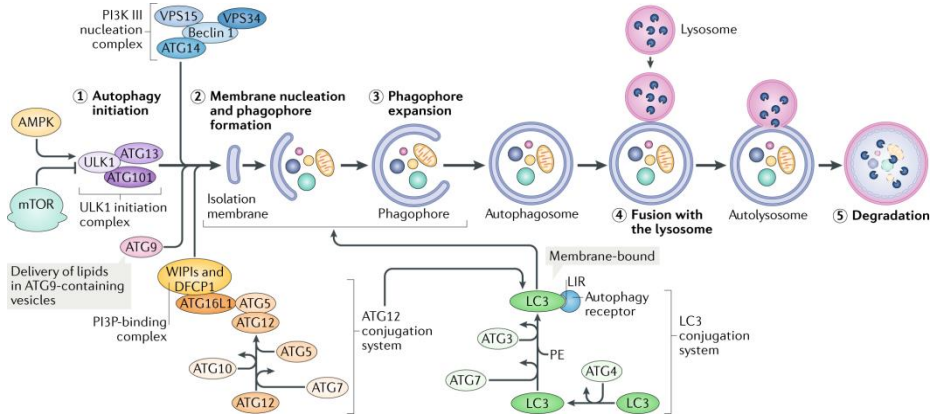


Figura 7. **Proceso de autofagia.** Esquema de la degradación de orgánulos y las proteínas y procesos implicados¹⁷⁷.

6.1 Mitofagia

La mitofagia es una forma especializada de autofagia en el que se degradan y reciclan las mitocondrias transportándolas a compartimientos hidrolíticos¹⁷⁸. La mitofagia se puede iniciar por diversos motivos tales como la escasez de nutrientes, la baja concentración de oxígeno, por envejecimiento mitocondrial o por la generación de algún fallo durante la biogénesis mitocondrial.

El objetivo primario de la mitofagia es evitar que mitocondrias defectuosas provoquen un exceso de ERO que podrían tener potenciales efectos perjudiciales para el resto de componentes celulares.

La importancia de la mitofagia en la homeostasis de enfermedades cardiovasculares se aprecia en estudios de delección de genes de

autofagia donde se han observado que desarrollaban enfermedades cardiovasculares de forma espontánea¹⁷⁹.

Varias proteínas están implicadas en la mitofagia, destacando entre ellas la *dynamin 1 like protein* (DNM1L), que tiene un papel regulador clave en la fisión mitocondrial, a su vez determinante en el proceso de mitofagia¹⁸⁰⁻¹⁸².

También se cree que la DNM1L contribuye a la remodelación de la pared de la aorta, ya que su expresión se activa en CML incubadas con Ang II y esta a su vez modula la actividad enzimática de la metaloproteinasa 2 (MMP2)¹⁸³.

7. Biogénesis mitocondrial

La biogénesis mitocondrial es el proceso mediante el cual nuevas mitocondrias son generadas por el crecimiento y división de las ya preexistentes en la célula. Este proceso, opuesto a la mitofagia, tiene como objetivo incrementar la masa mitocondrial, involucrando para ello la síntesis de membranas, proteínas mitocondriales y proteínas replicadoras del ADN mitocondrial (mtADN) e implica la coordinación de los genomas nucleares y mitocondriales¹⁸⁴.

El coactivador 1 alfa del receptor activado gamma del proliferador de peroxisoma (PGC1- α) se considera un regulador clave de la biogénesis mitocondrial ya que interactúa con dos factores de transcripción nucleares, el factor de respiración nuclear 1 y el 2 (NRF1 y NRF2), y a su vez la interacción entre estas dos proteínas activa el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), un regulador directo de la replicación y transcripción del ADN mitocondrial, activando la expresión de genes de la cadena respiratoria tales como mtCO3 que

codifica la subunidad 3 del complejo enzimático de la citocromo c oxidasa¹⁸⁵.

La interacción entre el estrés del retículo endoplasmático y la mitocondria promueven la generación de ERO y la apoptosis. Es por ello que las vías que modulan el estrés del RE o que regulan la biogénesis mitocondrial son potenciales dianas terapéuticas para mejorar la disfunción vascular y por tanto las enfermedades cardiovasculares. El empeoramiento de la función mitocondrial y la disminución de la biogénesis mitocondrial, junto con un incremento en el daño oxidativo, conlleva efectos deletéreos en el organismo^{186,187}.

En un estudio reciente se reportó la implicación de genes asociados con la disfunción mitocondrial en el AAA¹⁸⁸. Es más, en la capa íntima y media de muestras de AAA de pacientes se describió una bajada de expresión en PGC1 α y otros marcadores indicando un descenso en la biogénesis mitocondrial¹⁸⁹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis global es que **el estrés crónico del retículo endoplasmático (RE) y el estrés mitocondrial son responsables de la generación de estrés oxidativo y de la inducción** de procesos apoptóticos y de autofagia en la pared aórtica promoviendo la infiltración de células del sistema inmunológico y la degradación de la matriz extracelular en el AAA. El conjunto de estos procesos dan lugar al remodelado destructivo de la pared arterial alterando sus propiedades biomecánicas. A su vez formulamos 3 hipótesis específicas:

1. La expresión de los marcadores del estrés del RE, del estrés mitocondrial y de apoptosis estarán aumentados mientras que la biogénesis mitocondrial se encontrará disminuida en las muestras de AAA de pacientes en comparación con muestras de aorta abdominal procedente de donantes sanos.
2. El perfil lipídico de oxisteroles y otras moléculas circulantes estarán alterados en el plasma de pacientes y pueden correlacionar con el diámetro de la aorta aneurismática.
3. Tanto la inhibición farmacológica para reducir el estrés del RE in vivo como la deficiencia génica de marcadores del estrés del RE en animales de experimentación protegerán la pared vascular del remodelado destructivo que ocurre en el AAA y reducirán su incidencia.

Nuestro objetivo global es encontrar una terapia farmacológica capaz de limitar la degeneración de la pared vascular que ocurre en el aneurisma de aorta abdominal (AAA). Para ello, necesitamos esclarecer los mecanismos moleculares subyacentes a la fisiopatología del AAA.

El **objetivo principal** de esta tesis era explorar el papel del **estrés del retículo endoplasmático (RE)** y mitocondrial en el desarrollo del AAA y testar la efectividad de **nuevas terapias** basadas en la **inhibición del mismo** para **reducir la degeneración de la pared vascular** y **limitar la expansión del diámetro aórtico** que ocurre en esta enfermedad.

Para conseguir este objetivo nos planteamos a su vez 3 objetivos específicos:

1. **Analizar la expresión de marcadores del estrés del RE y mitocondrial como posibles dianas terapéuticas en muestras de AAA de pacientes** sometidos a cirugía de reparación en comparación con muestras de aorta abdominal procedente de donantes sanos **y cuantificar los niveles plasmáticos de oxisteroles y otros biomarcadores potenciales relacionados con el estrés del RE para determinar su valor pronóstico** y su posible co-relación con el diámetro de la aorta aneurismática.
2. **Determinar la eficacia de la inhibición farmacológica del estrés del RE** en animales de experimentación como estrategia terapéutica para limitar el desarrollo del AAA.
Para ello, estudiamos si el tratamiento in vivo con TUDCA y PBA, dos inhibidores clásicos del estrés del RE, limita la

progresión y ruptura del aneurisma en un modelo murino de AAA.

3. **Determinar si la deficiencia genética en el factor pro-apoptótico CHOP (*C/EBP homologous protein*), activado por estrés crónico del RE, previene la progresión del aneurisma en un modelo murino doble transgénico ($ApoE^{-/-}$ / $CHOP^{-/-}$).**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención y preparación de muestras de pacientes

1.1 Obtención de las muestras

Las muestras de aortas humanas de pacientes con aneurisma de aorta abdominal desechadas en cirugías abiertas de reparación se recogieron en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP) a través del servicio de Cirugía Vascul ar y se procesaron y almacenaron convenientemente por miembros de nuestro grupo para su posterior estudio. Las muestras se registraron en la colección C.0001021 en el instituto de Salud Carlos III. Por otro lado las aortas abdominales control fueron obtenidas de donantes multiorgánicos¹⁹⁰. Las muestras de los controles no mostraron evidencias de AAA.

Los plasmas control se consiguieron a través del banco de sangre y tejidos de Barcelona siguiendo los siguientes criterios de inclusión: sujetos en su mayoría de sexo masculino, no fumadores, no diabéticos y no hipertensos o con hipertensión controlada con edades comprendidas entre los 55 y 65 años.

Los plasmas de pacientes se corresponden con los pacientes de los que se obtuvieron las muestras de aorta aneurismáticas.

La aprobación para la recogida y uso de las muestras de pacientes se obtuvo a través del comité ético de investigación clínica (CEIC) del HSCSP y tras obtener el consentimiento informado del paciente. Así mismo, este estudio se ha desarrollado acorde con la declaración de Helsinki.

1.2 Preparación de las muestras

Parte de las muestras de tejido aneurismático y de aorta abdominal sana se fijaron mediante inmersión en una solución de paraformaldehído al 4%, parte se preservaron en un compuesto de

etilenglicol y resinas (OCT) (Tissue Tek, Sakura, Leiden, NL) y parte del tejido fue congelado en seco para su posterior procesamiento para extracción de ARN, ADN y proteína. En el caso de los tejidos en paraformaldehído al 4%, tras incubarlos durante 24 h a temperatura ambiente se sometieron a un proceso de deshidratación progresiva utilizando el equipo Shandon Citadel 2000 (Thermo) en dos baños de Gliofix de 30 minutos cada uno, cuatro baños de etanol absoluto de 45 minutos cada uno y tres baños de xilol de 45 minutos de duración cada uno. Finalmente las muestras se incluyeron en parafina líquida mediante el dispensador EG1150H (Leica) que solidifica a temperatura ambiente. Estas muestras fueron cortadas a 5 μm con un microtomo JUNG RM 2005 (Leica). Estos cortes se montaron sobre portaobjetos tratados a los que se les eliminaron todo los restos de agua secándolos a 40 °C durante 1 h.

Para la inclusión de los tejidos en OCT, el fragmento de tejido se cubrió con el OCT y se congeló progresivamente, primero en metilbutano y posteriormente se sumergió en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Parte del tejido fresco se congeló directamente en nitrógeno líquido para su conservación y almacenaje a -80 °C.

2. Cultivos celulares

2.1 Cultivo primario de células musculares lisas

Todos los experimentos de cultivos celulares se llevaron a cabo en células musculares lisas vasculares humanas (CML).

Las células se extrajeron a partir de explantes de aorta de donantes sanos (ver sección "obtención y preparación de muestras de

pacientes”). A la sección de aorta se le retiró la capa adventicia y la capa endotelial por acción mecánica, quedándose la capa media, que contiene las musculares lisas. A continuación es troceada en fragmentos de pequeño tamaño de alrededor de 1 mm² (explantos). Estos explantes fueron colocados en una placa, cubiertos con medio completo (tabla 1), mantenidos en una incubadora de cultivos a 37 °C y en una atmósfera al 5 % de CO₂. Cada 3 días se renovó el medio y alrededor de las 2-3 semanas las células empezaron a migrar. Cuando llegaron a un grado de confluencia elevado se tripsinizaron y se subcultivaron. Para realizar los ensayos, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 21% de O₂. Para mantener un stock de células, éstas se congelaron en Suero bovino fetal (SBF) al 7,5% de DMSO, a una densidad de 10⁶ células/ml.

Tabla 1.

Medio M199	Porcentaje
Suero bovino fetal (SBF)	20%
Suero humano	2%
L-Glutamina	1%
Penicilina - estreptavidina	1%
Piruvato	1%

La tripsinización se llevó a cabo aspirando el medio y lavando 2 veces con PBS atemperado. Seguidamente se incubó con un volumen mínimo de tripsina – EDTA (Gibco, BRL) en un incubador a 37 °C hasta que las células empiezan a despegarse de la placa. A continuación y tras añadir el doble de volumen de medio completo que el usado de tripsina, se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm y se añadió medio completo atemperado para su resuspensión. El contaje

de células se realizó con cámara Neubauer, después de teñir con azul de tripán y se sembraron en placas a una densidad de 10.000 células / cm².

Para los ensayos experimentales, se utilizaron células con un pase entre 3 y 6, sembradas hasta una confluencia del 80 - 90% y ayunadas con medio suplementado con SBF al 1% durante 24 h antes de iniciar el tratamiento.

2.2 Tratamiento de cultivos primarios de CML

Las células se incubaron con 7-cetocolesterol (7-KC) (Sigma Aldrich) (15 - 30 µM diluido en etanol) durante 24 h - 48 h y / o con Ang II (Sigma Aldrich) (10⁻⁷ M, diluido en PBS) durante 48 h.

Para el tratamiento con los agentes antioxidantes N-acetil cisteína (NAC) y 4-Hidroxi-TEMPO (Sigma Aldrich), las CML se preincubaron durante 1 h antes de añadir el 7-KC.

3. Experimentación en modelos murinos

3.1 Manipulación y estabulación de los animales

Los ratones de la cepa ApoE^{-/-} (B6.129P2 - ApoE^{tm1Unc}/J, 002052, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) (Piedrahita JA, 1992), los de la cepa CHOP^{-/-} (B6.129S(Cg) - Ddit3^{tm2.1Dron}/J (MGI J:137887), 005530, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) y los ratones de la cepa C57 (C57BL6/J, 000664, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) se mantuvieron en ciclos de luz / oscuridad de 12 h a una temperatura de 21 °C (±1). Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial estándar (2014C Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Iberica S.L.). Todos los procedimientos realizados han sido aprobados por el comité ético del IIB - Sant Pau tal y como estipula la ley 5/1995 del 21 de junio

aprobada por la Generalitat de Catalunya, siguiendo la política estatal española de Protección de los animales RD53/2013, que cumple a su vez con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE.

3.2 Supervisión del Bienestar animal

Los animales estuvieron bajo supervisión siguiendo unos parámetros estándar, evaluando y puntuando expuestos en la siguiente tabla.

Tabla 2.

Parámetros de supervisión animal
Criterios
Pérdida de peso
(0) Peso normal. (1) Menor del 10%. (2) Entre un 10 y un 15%. (3) Consistente o rápida, Superior a un 20% mantenida durante 72h.
Aspecto físico
(0) Normal. (1) Deshidratación, delgadez. Cambios en el color de la piel. (2) Piloerección, “no brillante”, “despeinado”. Palidez. Cianosis. (3) Encorvamiento (indicativo de dolor). Pérdida de masa muscular (emaciación).
Signos clínicos
(0) Ninguna. (1) Hipotermia, respiración laboriosa (2) Secreciones mucosas y/o sanguinolentas por cualquier orificio. Diarrea. Órganos hipertrofiados detectables (ganglios, bazo, hígado). (3) Temblores, convulsiones, descarga nasal y/o cianosis, Caquexia.
Alteraciones de la conducta
(0) Ninguna. (1) Incapacidad de moverse con normalidad, agresividad. (2) Dificultad de llegar a la comida / bebida. Aislamiento del resto de los animales de la jaula. (3) Inconsciente o comatoso. Intención de “escondarse” en la viruta, no responde a estímulos (Moribundo).
Heridas
(0) Ninguna. (1) Arañazos. (2) Heridas que no cicatrizan. (3) Heridas ulceradas que pueden incluso supurar.

3.3 Fundación y mantenimiento de colonias murinas

Tras la adquisición de los modelos murinos (ApoE^{-/-} (B6.129P2 - ApoE^{tm1Unc}/J), CHOP^{-/-} (B6.129S (Cg) - Ddit3^{tm2.1Dron}/J y C57BL6J)) en la casa comercial *Jackson Laboratories* (CHOP) y *Charles River* (ApoE y C57) se empezaron a generar los modelos de interés cruzando los animales modificados genéticamente con los animales de genotipo silvestre y con cruces sucesivos entre la prole de la primera generación y evitando al máximo la endogamia. Los cruces se realizaron durante 2 semanas tras las cuales se separaron las parejas y las hembras se mantuvieron individualizadas otras dos semanas a la espera de posibles partos. Durante este periodo de tiempo fueron alimentadas con un pienso especial para cría, más rico en nutrientes (2019 *Teklad Global 19% Protein Extruded Rodent Diet*, *Harlan Iberica SL*, España). Pasadas 4 semanas tras el nacimiento de las crías, estas se destetaron y se marcaron para su posterior identificación. Al mismo tiempo se cogió un fragmento de tejido de la punta de la cola para el consiguiente genotipado. Para empezar el procedimiento experimental o para cruzar los animales se esperaba a que estos alcanzaran la edad adulta (2 meses y medio de vida).

Para generar la colonia de ratones deficientes en Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), se cruzaron hembras C57BL6J con machos de la cepa B6.129P2 - ApoE^{tm1Unc}/J y se generaron animales heterocigotos para ApoE en la generación F1, que al alcanzar la madurez se cruzaron para generar la F2. De los ratones machos de la generación F2 se obtuvieron animales homocigotos deficientes en Apolipoproteína E en una proporción aproximada del 25% y un 50% de animales heterocigotos. Los animales homocigotos (ApoE^{-/-}) se cruzaron entre sí y con los animales obtenidos a partir de la generación F3 se pusieron cruces sucesivos y realizamos nuestros estudios experimentales.

Parte de los animales ApoE^{-/-} generados se cruzaron con la cepa de ratones deficientes en el factor de transcripción pro-apoptótico CHOP codificado por el gen Ddit3 (B6.129S (Cg) - Ddit3^{tm2.1Dron}/J) con el objetivo de obtener un modelo doble transgénico (ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-}). Tras cruzarlos se obtuvieron una F1 de doble heterocigotos para ambos genes, y tras cruzarlos entre sí, se obtuvo la generación F2 compuesta por animales portadores de todos los genotipos posibles: heterocigotos para CHOP (CHOP^{+/-}) y homocigotos para ApoE (ApoE^{-/-}); heterocigotos para la deficiencia en ApoE y deficientes en CHOP^{-/-}; heterocigotos para la deficiencia en ambos genes y un menor porcentaje de animales con el genotipo de interés doble deficientes para ApoE y CHOP (con una proporción del 6,25%). Tanto los animales doble deficientes (ApoE^{-/-}/CHOP^{-/-}) como los animales deficientes en CHOP o ApoE y heterocigotos para uno u otro gen se cruzaron entre sí para dar lugar a la generación F3 donde el porcentaje de animales con el genotipo de interés (ApoE^{-/-}/CHOP^{-/-}) resultó ser del 25%. Estos animales no hermanos se cruzaron para obtener la generación F4, de la que se obtuvieron el 100 % de animales doble deficientes (ApoE^{-/-}/CHOP^{-/-}) que se utilizaron en los procedimientos experimentales.

3.4 Genotipado de los ratones

Para el genotipado, a los ratones de un mes se les cortó un fragmento de la cola al separarlos de la madre y marcarlos para su identificación. Este fragmento de cola fue digerido en 100 µL de tampón de digestión (50 mM Tris pH 8, 50 mM KCl, 2,5 mM EDTA y 0.45% del detergente Nonidet P40 o NP40) que contenía proteinasa K (1/50) (Qiagen, Hilden, Alemania) a 56°C durante 18 h en un baño seco para la extracción del ADN genómico.

Tras completar su digestión, la solución se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, donde se halla el ADN genómico. A continuación el ADN diluido 1/10 se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicamente diseñados para el genotipado de cada cepa de ratón por la casa comercial y mediante el kit MyTaq (Bioline, Meridian Bioscience, OH, USA) en un termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied biosystems, CA, USA) y que se detallan a continuación en las tablas 3 y 4:

Tabla 3.

Oligonucleótidos para genotipar ApoE ^{-/-}		Región
oIMR0180	5'-GCCTAGCCGAGAGCCG-3'	Común
oIMR0181	5'-TGTGACTTGGTGCAGC-3'	Mutante anti - sentido
oIMR0182	5'-GCCGCCCGAGCATCT-3'	Natural anti - sentido

Tabla 4.

Oligonucleótidos para genotipar CHOP ^{-/-}		Región
CHOP1	5'-ATGCCCTTACATCGTG-3'	Común
CHOP2	5'-ACCGCCAGGGCAGTCA-3'	Mutante anti - sentido
CHOP3	5'-GCAGGGTCAAGTAGTG-3'	Natural anti - sentido

Para el genotipado seguimos un programa de amplificación específico dependiendo de la cepa de ratón que se detalla a continuación en las tablas 5 y 6.

Tabla 5.

Programa PCR ApoE			
Fases	Temp °C	Tiempo	Notas
1	94	3 min	
2	94	30 seg	
3	68	40 seg	
4	72	1 min	
5			Repetir 35 ciclos de las fases 2 - 4
6	72	2 min	
7	4	∞	

Tabla 6.

Programa PCR Chop			
Fases	Temp °C	Tiempo	Notas
1	94	2 min	
2	94	20 seg	
3	65	15 seg	Reducción de 0.5 C, hasta 60 C*
4	68	10 seg	
5			Repetir 10 ciclos de fases 2 - 4
6	94	15 seg	
7	60	15 seg	
8	72	10 seg	
9			Repetir 28 ciclos de las fases 6-8
10	72	2 min	
11	10	∞	

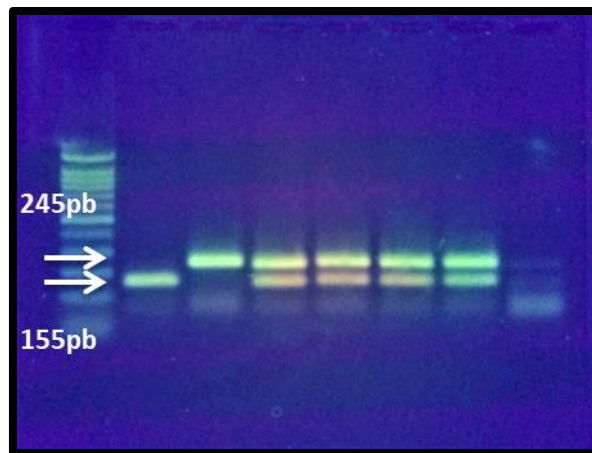
*Esta fase consiste en 10 ciclos, empezando en 65 °C y reduciendo 0,5°C sucesivamente en cada ciclo (64.5, 64.0, 63.5, 63.0, etc.) hasta llegar a los 60 °C.

Se añadió al resultado de la PCR tampón de carga y se resolvió en un gel de agarosa al 1,8 % con GELSAFE *Nucleic Acid Gel Stain Solution* (1/20000), utilizando para ello el kit comercial (DANAGEN, La Roca del Valles, Barcelona, España) y en paralelo con un marcador de peso molecular de ADN (DANAGEN, La Roca del Valles, Barcelona, España). Al transiluminador se visualizaron las siguientes bandas:

ApoE

Mutante: 245 pb

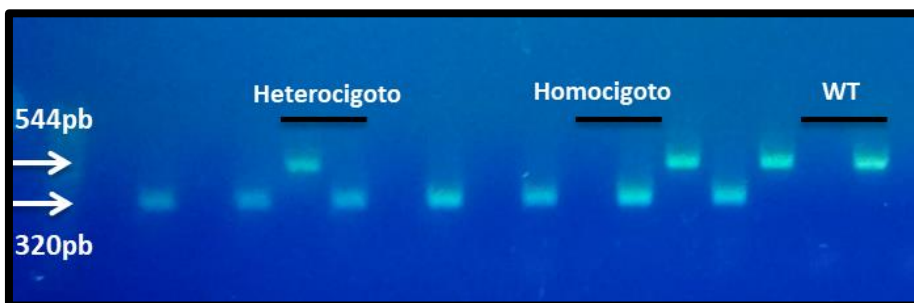
WT: 155 pb



CHOP

Mutante: 320 pb

WT: 544 pb



3.5 Implantación de las minibombas

Los modelos murinos fueron sometidos a cirugía para implantar las minibombas osmóticas subcutáneamente (Alzet, modelo 1004) entre las 8 y 12 semanas de vida. Las minibombas se cargaron previamente con angiotensina II (Ang II) mediante un jeringuilla con aguja sin bisel (100 μ l con una liberación constante de 1000 ng / Kg / día), tras lo cual se activaron sumergiéndolas 5-6 h en solución salina a temperatura ambiente. Para la operación, el ratón se anestesió con isoflurano (Abbot Laboratories, Chicago, IL, USA) al 2% con oxígeno, se le depiló la zona de la nuca y se desinfectó con povidona yodada. A continuación se practicó una pequeña incisión de alrededor de 1 cm y con unas tijeras curvas se crea un bolsillo subcutáneo paralelo a la espalda y levemente girado hacia una de las extremidades inferiores. En la incisión se introduce la minibomba ya activada y, finalmente, se cerró el corte con pegamento quirúrgico, Histoacryl (Braun, Kronberg, Alemania).

3.6 Tratamiento farmacológico del modelo murino

Los modelos de aneurisma murinos fueron tratados con diferentes fármacos para testar su función en la formación, progresión y ruptura del aneurisma. Los químicos testados fueron el fenilbutirato de sodio (PBA) a una dosis de 1g / Kg / día y el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) a una concentración de 150 mg / Kg / día. Ambos compuestos se administraron por inyección intraperitoneal 3 días a la semana durante las cuatro semanas de infusión con Ang II y desde el día 1 de implantación de la minibomba.

El PBA es un químico que es capaz de intervenir en múltiples reacciones enzimáticas, en la actualidad es usado en el tratamiento de trastornos en el ciclo de la urea ayudando a reducir los niveles de amoníaco y glutamina plasmáticas. Entre los diversos efectos que

presenta cabe destacar el papel inhibitorio del estrés del retículo endoplasmático (RE)¹⁹¹.

El TUDCA es un ácido biliar anfifílico y su uso como fármaco no está aprobado por la Fundación estadounidense de administración de medicamentos y alimentos (FDA). Estudios recientes muestran un amplio abanico de efectos destacando la inhibición del estrés del RE y su acción antiapoptótica¹⁹².

3.7 Medición de la presión arterial en el ratón por la técnica del manguito en la cola.

Las medidas de la presión sistólica se realizaron con los ratones conscientes e inmovilizados mediante un cepo. Los ratones fueron adaptados previamente a la toma de medidas para reducir el impacto que conlleva la inmovilización en el estrés del animal. Las medidas se realizaron con un sistema no invasivo, mediante el uso del manguito en la cola que determina la presión arterial del ratón a través de la cola del mismo (Kent Scientific, Torrington, CT, USA) y con el software CODA *high Through put System* (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Se realizaron 20 medidas por cada ratón una vez a la semana, durante 6 semanas, iniciando la adaptación al cepo y las lecturas 14 días antes de comenzar el tratamiento.

3.8 Seguimiento del diámetro de la aorta mediante ultrasonografía

Con el uso de la plataforma de imagen digital de alta frecuencia y resolución VeVo 2100 (Visual Sonics, Tokio, Japón) y con el transductor lineal M400 *MicroScan Transducer* (30 mHz) se realizaron ecografías de la aorta de los ratones de forma semanal durante 4 semanas. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2% con oxígeno, y se prepararon para la ecografía con la depilación de la zona abdominal. El ratón se coloca en posición supina sobre una

plataforma a 37 °C para mantener su temperatura corporal y colocando sus extremidades sobre unos electrodos que permiten la monitorización de sus constantes vitales durante el proceso.

Las imágenes fueron captadas tanto en cortes sagitales como en cortes longitudinales. Para la captura sagital el transductor se colocó debajo del esternón en perpendicular y se hizo un barrido hacia la zona inferior del animal hasta la bifurcación de las arterias renales. Para la captura longitudinal, el transductor se colocó de forma paralela al animal y se situó debajo del esternón haciendo, en este caso, un barrido lateral del animal.

Las mediciones se hicieron siempre en la región suprarrenal y en diástole para conseguir el máximo diámetro posible.

3.9 Obtención de tejidos de ratón

Tras el estudio experimental los ratones fueron sacrificados siguiendo el criterio de punto final. Para su sacrificio se les suministró una sobredosis de isoflurano al 5 % con oxígeno, cuando se observó la ausencia de reflejos, se procedió a la extracción de sangre mediante punción cardiaca. El ratón fue perfundido con solución salina y tras ello se extrajeron aorta, corazón, riñón, hígado y otros tejidos de interés.

4. Análisis de la expresión de ARN mensajero

4.1 Extracción de ARN

El ARN se extrajo de las células musculares lisas tras su tratamiento mediante el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Para aislar el ARN de las muestras de tejido humanas se utilizó el kit *RNeasy Fibrous Mini Kit* (Qiagen, Venlo, Países Bajos)

siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, para extraer las muestras de tejido de ratón, el tejido se homogeneizó en el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) con ayuda de un homogenizador (Tissue Ruptor II, Qiagen) y siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. La integridad del ARN se determinó por electroforesis en geles de agarosa.

4.2 Cuantificación del ARN

El ARN extraído previamente se midió utilizando un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific), a una longitud de onda de 260 nm, que a su vez nos determina la pureza del ARN obtenido mediante los cocientes 260/280 y 260/230 que tiene que estar dentro de los rangos 1,8 - 2,0 y 2,0 - 2,2 respectivamente, y que determinan la calidad y pureza de la muestra.

4.3 PCR a tiempo real

Para estudiar la expresión de los genes de interés se cuantificó el ARN mensajero (ARNm) mediante la PCR a tiempo real. Para ello, el ARNm se retrotranscribió a ADN de cadena complementaria sencilla (ADNc) utilizando el kit *High Capacity RNA to DNA* (Applied biosystems, Foster City, CA, USA) que se empleó posteriormente como ADN molde en la reacción de PCR a tiempo real utilizando un termociclador ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems). El protocolo de amplificación cambió dependiendo del uso de sondas taqman (Applied Biosystems) o SYBR-Green (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA).

El uso de sondas TaqMan permite medir la amplificación de productos de PCR mediante un sistema de dos oligonucleótidos cebadores y una sonda específica para la secuencia diana. La sonda tiene un

fluorocromo en su extremo 3' y una molécula inhibidora (*Quencher*) en 5' que, por proximidad, bloquea la emisión de fluorescencia del primero. Cuando la polimerasa alcanza la sonda la hidroliza y el *quencher* se separa del fluorocromo, lo que permite la emisión de fluorescencia.

SYBR-Green es un agente intercalante que se inserta en la hélice de ADN, incrementando su tasa de emisión fluorescente con una absorción y emisión de 498 y 522 nm respectivamente. Se pueden detectar y cuantificar en cada fase de síntesis de ADN durante una PCR a tiempo real, lo que permite conocer la expresión relativa de los ARNm. Para usar este método se utilizan unos oligonucleótidos directos (F) o inversos (R) diseñados para amplificar un gen concreto (www.Biomers.net, Donau, Alemania).

Mediante este análisis se midió la expresión génica de proteínas implicadas en el estrés del RE, la biogénesis mitocondrial y el estrés oxidativo. Se utilizó la expresión génica de GAPDH y Beta-actina como referencia y como controles de expresión endógena. Los resultados se analizaron y se expresaron usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 7.

Sondas taqman humanas	
Sonda	Referencia
ATF6	Hs00909586_g1
DDIT3	Hs99999172_m1
XBP1	Hs00231936_m1
ATF4	Hs00909569_g1
HSPA5	Hs99999174_m1
ERN1	HS00176385_m1
SEL1L	Hs01071406_m1
CRELD2	Hs00360923_g1
MT-CO3	Hs02596866_g1
CYBB	Hs00166163_m1
CYBA	Hs00609145_m1
MMP2	Hs01548727_m1
IL1B	Hs01555410_m1
NOX4	Hs01379108_m1
NFE2L2	Hs00975961_g1
Beta-actina	Hs99999903_m1
GAPDH	Hs02758991_g1

Tabla 8.

Sondas taqman murinas	
Sonda	Referencia
ATF6	Mm01295319_m1
DDIT3	Mm01135937_g1
ATF4	Mm005105325_g1
HSPA5	Mm00517691_m1
ERN1	Mm00470233_m1
COX3	Mm04225261_g1
Nfe2l2	Mm00477784_m1
Beta-actina	Mm02619580_g1
GAPDH	Mm99999915_g1

Tabla 9.

SYBR Green
PGC1 α
F 5'-CCTGTGGATGAAGACGGATT-3'
R 5'-TAGCTGAGTGTGGCTGGTG-3'
TFAM
F 5'-GATGCTTTAGGGCGGAG-3'
R 5'-GCTGAACGAGGTCTTTTTGG-3'
NRF1
F 5'-GATCGTCTTGCTCTGGGGAAA-3'
R 5'-GGTGACTGCGCTGTCTGATA-3'
CytB
F 5'-AGACAGTCCCACCCTCACAC-3'
R 5'-AAGAGAAGTAAGCCGAGGGC-3'

5. Histología básica

5.1 Desparafinado de las muestras para su uso

Previo al uso de las muestras se tienen que eliminar la parafina que podría interferir en la tinción de los diferentes elementos y estructuras de las muestras. Para llevar a cabo este proceso de desparafinado se debe seguir el proceso inverso de la parafinación; Inicialmente se utilizan 2 baños de xilol de 5 minutos cada uno y a continuación se inicia la hidratación consecutiva con baños de etanol, 2 lavados de 5 minutos por cada uno, al 100%, 95%, 70% y finalmente con agua destilada.

5.2 Hematoxilina Eosina

Se trata de una tinción que tiñe, gracias a la hematoxilina, las estructuras con pH ácido, como los núcleos celulares, en azul y las estructuras con pH básico, como el citoplasma celular, son teñidas por acción de la eosina de un color rosado. Las muestras de tejido fueron desparafinadas y a continuación se tiñeron 5 min con hematoxilina tras lo cual se lavaron con agua corriente durante 5 minutos y posteriormente se tiñeron durante 1 minuto con eosina y se lavaron de nuevo con agua corriente durante 5 min. A continuación se procedió con la deshidratación seriada consistente en 2 lavados de 5 min en etanol 70%, 95%, 100% y un lavado final con xilol. Finalmente las muestras se montaron con medio de montaje DPX (Sigma - Aldrich, MO, USA).

5.3 Tricrómico

Se trata de una tinción compuesta por 3 tintes que da como resultado una tinción de núcleos en color negro, citoplasma en color rosado, músculo en color rojo y el colágeno en color azul verdoso. Las muestras de tejido fueron desparafinadas antes de proceder con la

tinción seriada (ver sección Desparafinado de las muestras para su uso). Inicialmente los portas se trataron con una solución de Bouin, un mordiente, durante 1 hora seguido de un lavado en agua corriente de 5 min y de tinción con hematoxilina durante 10 min tras lo cual se efectuó un nuevo lavado con agua corriente de 5 min. A continuación se tiñeron con escarlata-fucsina durante 5 min, se lavaron con agua destilada y se trataron con una solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 15 min. Finalmente las muestras se tiñeron con azul de anilina durante otros 15 min, se lavaron con agua destilada durante 5 min y se incubaron en una solución de acético al 1% durante 3 min. Las muestras se deshidrataron (ver sección hematoxilina eosina) y se montaron con DPX (Sigma - Aldrich, MO, USA).

5.4 Orceína

Es un método de tinción de fibras de elastina. En nuestro caso se usó para el estudio de la integridad de las láminas de elastina en cortes histológicos de tejido parafinado. Para la tinción se siguieron las instrucciones del fabricante del kit comercial de tinción de orceína (Casa Álvarez, Barcelona, España).

5.5 Rojo Sirio

La tinción con rojo sirio marca de forma específica el colágeno y permite observar el grado de entrecruzamiento de las fibras al observarlas bajo luz polarizada. Este gradiente de entrecruzamiento es observable con los diferentes tonos de color, verde y amarillo correspondiente con pocas fibras entrecruzadas y naranja y rojo correspondiente a un alto grado de entrecruzamiento.

Brevemente, las preparaciones se desparafinaron y sumergieron durante 1 h en solución rojo sirio, se lavaron en agua con ácido

acético por 3 min y se procedió a su deshidratación en etanol 70%, 95%, 100% y xilol en baños sucesivos de 3 min cada uno. Finalmente las muestras se montaron en DPX (Sigma - Aldrich, MO, USA).

6. Análisis de la expresión de proteína

6.1 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Las muestras fueron marcadas con diversos anticuerpos para observar su expresión y localización en el tejido aneurismático de pacientes con AAA y donantes de aorta multiorgánicos. Tras la desparafinación de los cortes de aorta abdominal. Las muestras se sumergieron en tampón citrato a pH 6 en un baño a 95 °C por 20 min para la recuperación de la expresión antigénica. Seguidamente se dejaron enfriar 30 min a temperatura ambiente. A continuación las muestras se lavaron en PBS (5 min, 3 veces), se incubaron con una solución de PBS con tritón x-100 al 1% para permeabilizar el tejido y seguidamente, en el caso de las tinciones mediante inmunohistoquímica IHQ, se trataron con peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 30 minutos para bloquear la actividad enzimática peroxidasa. Se bloquearon los uniones inespecíficas con una solución de albúmina bovina fetal al 5% en PBS tritón x-100 al 0.1% durante 1 h y finalmente se añadió el anticuerpo de interés diluido en solución de bloqueo. Incubando toda la noche a 4 °C.

Tabla 10.

Tabla de anticuerpos	
Anticuerpo	Referencia
CHOP	9661, Cell Signaling, Boston (USA)
cCaspase 3	9661, Cell Signaling, Boston (USA)
XBP1	NBP1 - 77681, Novus Biological (USA)
ATF6	NBP1 - 40256, Novus Biological (USA)
α -actina	ab5694, Abcam (United Kingdom)
CD3	SK202, Dako (USA)
CD68	M0876, Dako (USA)
GDF15	NBP1-81050, Novus Biological (USA)
S100A4	NBP1-89402, Novus Biological (USA)

Al día siguiente se lavaron en PBS (5 min, 3 veces) y se incubó con un anticuerpo secundario marcado con avidina-biotina (Vector Laboratories, Peterborough, UK) o bien con anticuerpos secundarios marcados (anti - ratón, anti - cabra o anti - conejo) con un fluorocromo 488 o 594 (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA) diluido a 1/200 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras marcadas con fluorocromo se lavaron con PBS (5 min por 3 veces) y se montaron con el reactivo *Prolong Gold Antifade* con DAPI (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA). Por otro lado las muestras con avidina-biotina se lavaron con PBS (5 min, 3 veces) y se sumergieron con el reactivo ABC del kit Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 min. Tras lo cual se trataron con el sustrato DAB (Roche, Basilea, Suiza). Esta reacción se paró con agua corriente y se

montaron con medio de montaje Glicergel (Dako, Santa Clara, CA, USA).

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante el equipo de microscopía TCS-SP5 Leica Confocal (Leica, Germany).

6.2 Medición del estrés oxidativo

6.2.1 Detección de anión superóxido mediante dihidroetidio

La cuantificación del anión superóxido se realizó mediante la detección de emisión de fluorescencia por Dihidroetidio (DHE) (Sigma). Esta molécula es capaz de entrar en la célula gracias a su capacidad de permeabilización a través de la membrana celular. El dihidroetidio se oxida a etidio cuando reacciona con el anión superóxido intracelular y este se une al ADN emitiendo fluorescencia a una longitud de onda de 590 - 620 nm.

Para su detección se utilizaron cortes de donantes y pacientes procedentes de tejidos frescos preservados en OCT. En primer lugar, los cortes se incubaron a 37 °C durante 1 h para secar la muestra y aumentar su adhesión al portaobjetos, a continuación se cubrieron las secciones con Krebs - HEPES (en mM: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl₂, 0.24 MgCl₂, 8.3 HEPES, 11 Glucosa, pH = 7.4) a 37 °C en una cámara húmeda durante 30 min. El DHE se preparó en Krebs - HEPES a una concentración final de 5 µM y se volvió a cubrir las secciones con la solución de DHE durante 30 min a 37 °C. A continuación se realizaron 3 lavados sucesivos con solución Krebs - HEPES para eliminar el exceso de sonda y finalmente, las muestras se montaron con el reactivo *Prolong Gold Antifade* (Life Technologies). Inmediatamente después se capturaron las imágenes en el microscopio a una longitud de onda de excitación de 563 nm.

6.2.2 Detección mediante MitoSOX red

La sonda fluorescente MitoSOX Red (Molecular Probes) es un marcador del estrés oxidativo, más específicamente del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) generado en la mitocondria. Al entrar en la mitocondria el producto se oxida exclusivamente por la acción del anión superóxido y no por otras especies reactivas de oxígeno (ERO) o especies reactivas de nitrógeno. Emitiendo fluorescencia.

Para su detección, al igual que con el DHE, se utilizaron cortes de donantes y pacientes procedentes de tejido fresco preservado en OCT. En primer lugar los cortes se incubaron a 37 °C durante 1 h para aumentar su fijación, a continuación las secciones se cubrieron con PBS en una cámara húmeda durante 30 min. El MitoSOX Red se diluyó en PBS (previamente resuspendido en DMSO a una concentración de 50 mM en stock) a una concentración final de 5 μ M y se cubrieron las secciones con esta solución durante 30 min. A continuación se lavaron con PBS 2 veces eliminando siempre el exceso de líquido anterior y se dejaron secar brevemente. Finalmente la preparación se montó con el reactivo *Prolong Gold Antifade* (Lifetechnologies). Inmediatamente después se capturaron las imágenes en el microscopio confocal TCS-SP5 (Leica) excitando a 510 nm para que emita a 580 nm.

6.2.3 Medición del estrés oxidativo en plasma

La cuantificación del estrés oxidativo en plasma de pacientes se determinó por HPLC (*high performance liquid chromatography*) mediante la detección de fluorescencia emitida por el compuesto 2-hidroietidio (2-EOH) y siguiendo la metodología descrita por Laurindo y col, 2008¹⁹³. Un volumen de 25 μ L de plasma se incubó con una solución de la sonda dihidroetidina 0,8 μ M (DHE, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en PBS, después se centrifugó

durante 5 minutos a 10000 g y el sobrenadante se inyectó en el sistema cromatográfico (fase móvil: 65% de agua con ácido trifluoroacético al 0,3%: 35% de acetonitrilo; flujo 1ml / min; columna kromasil C-18, 5 µm, 200x4.6 mm- Teknokroma Analítica; longitud de onda de excitación a 510 nm, longitud de onda de emisión a 595 nm). Tal y como otros autores ha descrito previamente el sistema xantina / xantina oxidasa se utilizó para calibrar la señal de O_2^{-194} . La curva de calibrado se obtuvo comparando la producción de 2-EOH y el ratio de la actividad Xantina oxidasa entre la concentración de DHE (85-605 nU XO/ng HE).

6.3 Ensayos de apoptosis

6.3.1 DeadEnd Fluorometric TUNEL System

El marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL) es un método para detectar fragmentación de ADN. La fragmentación del ADN se da en una de las etapas tardías de la apoptosis celular y el sistema *DeadEnd Fluorometric TUNEL system* (Promega, Madison, WI, USA) está diseñado específicamente para la detección de células apoptóticas.

En nuestro caso, las células apoptóticas se detectaron en tejido parafinado siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial.

6.3.2 Citometría de flujo

Los niveles de apoptosis celular en las células CML humanas, se cuantificó mediante citometría de flujo y mediante el Kit *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD, Pharmingen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Consiste en el marcaje de la fosfatidil serina con anexina V, combinado con el marcaje con 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) con una fuerte afinidad hacia el ADN. Los experimentos de citometría de flujo se hicieron en un equipo Beckman Coulter's Epics

XL flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA). Por cada muestra se adquirieron como mínimo 10.000 eventos, utilizando como control negativo las muestras incubadas con las soluciones vehículo. Los datos se analizaron con el software Expo32 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

6.4 Extracción de proteínas de células en cultivo

Para la extracción de proteína de células, estas se lavaron 2 veces con PBS y se lisaron con tampón de lisis RIPA (80-100 μL /pocillo 10 cm^2) cuya composición se detalla en la tabla 10.

Tabla 11.

Tampón de lisis RIPA	
Producto	Concentración
Tris - Cl pH 7.4	10 mM
EDTA	1 mM
EGTA	0.5 mM
Tritón x-100	1%
Sodio desoxicolato	0.1%
SDS	0.1%
NaCl	140 mM
Cóctel inhibidor de proteasas	1x (CIP) (Sigma aldrich)

Los lisados se recogieron con un raspador y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se volvieron a descongelar para disgregarlas mecánicamente con la ayuda de una jeringa de 29 G. Se centrifugó (16000 g, 5 min) y se recogió el sobrenadante. Finalmente el extracto se puede conservar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

6.5 Extracción de proteínas de tejido murino

La extracción de proteína desde tejido murino se hizo utilizando el reactivo *TriPure Isolation Reagent* (116671, Roche, Sigma - Aldrich) y se siguió el protocolo establecido por la casa comercial. A partir de la fase fenólica conteniendo proteína y ADN, tras la separación de la fase que contiene el ARN. Los extractos se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las muestras humanas se prepararon en tampón RIPA utilizando un *Tissue Ruptor* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo un protocolo estándar.

6.6 Determinación de la concentración proteica

La determinación de los niveles de proteína se midieron mediante el uso del ácido bicinconónico (BCA), que utiliza la reacción de biuret (reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} causado por la presencia de proteínas en medio básico), unido a una detección colorimétrica del Cu^{+1} . En este caso utilizamos el *Rapid Gold BCA Protein Assay Kit* (Pierce Biotechnology, Appleton, WI, USA), siguiendo el protocolo facilitado por la casa comercial.

6.7 Western - Blot

Para el ensayo de western blot, los extractos proteicos se hirvieron durante 5 min en tampón de Laemmli 1 x. (Tris - HCl 125 mM, SDS 2%, Glicerol 5%, azul de bromofenol 0,003% y β -mercaptoetanol 1%) como paso previo a la resolución por electroforesis en condiciones reductoras, en un gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS - PAGE, geles del 10 % al 12 % de acrilamida :bisacrilamida 37,5 : 1) en paralelo con un marcador de peso molecular. Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon-P, poro de $0,45\text{ }\mu\text{M}$; Millipore) en tampón de transferencia con metanol durante 90 min, a 200 mA a 4

°C. Las membranas se incubaron con la solución de bloqueo durante 1 h (solución al 5% de leche desnatada en polvo Sveltesse® en Tampón Tris salino (NaCl 100 mM; Trizma Base 10 mM a pH 7.5) con detergente Tween (TBS – Tween) al 0,05%. Tras lo cual se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4 °C. Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con TBS - Tween 0,05% (2 veces, 15 min) y posteriormente con TBS (1 vez, 15 min) a temperatura ambiente y en agitación. La unión del anticuerpo primario a la proteína de interés se detectó mediante la incubación (1 h a temperatura ambiente) con un anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (*HorseradishPeroxidase*, HRP). Las membranas se lavaron como se indicó anteriormente y se incubaron con un solución de ECL Immobilon Forte Western HRP Substrate (Millipore, Burlington, MA, USA) durante 1 min para proceder a su revelado. Este compuesto actúa de sustrato para la HRP y permite detectar una señal quimioluminiscente mediante la exposición de películas autorradiográficas CURIX rp2 plus (Agfa), que se revelaron por procedimientos fotográficos estándares. Para verificar que la carga de proteína fuese homogénea se determinaron los niveles de β -actina o GAPDH. Las películas se escanearon en el densitómetro GS-800 (BIO - RAD) y la cuantificación relativa de las bandas se realizó mediante el uso del programa QuantityOne (BIO - RAD).

6.8 Zimografía

La actividad gelatinolítica de las metaloproteinasas MMP9 y MMP2 se cuantificó mediante zimografía clásica en los lisados de proteína de la aorta abdominal de ratones. Para ello, 30 μ g de proteína se resolvieron en gel de poliacrilamida al 10 % con SDS co-polimerizado con 1 mg / ml de gelatina de piel porcina tipo A (Sigma-Aldrich), como sustrato de la actividad enzimática de las metaloproteinasas. La

electroforesis se desarrolló a 4°C durante 4 h, tras la cual los geles se lavaron durante 30 min a temperatura ambiente en una solución de tritón X-100 al 2.5 % (Sigma-Aldrich) y posteriormente se incubaron con tampón sustrato (50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ (Merck) y 0.02 % (p/v) N₃Na (Fluka), pH 8) durante 18 h a 37°C. A continuación los geles se tiñeron con una solución de *Coomassie® Brilliant blue R 250* (Sigma-Aldrich) preparada siguiendo las instrucciones del fabricante durante 15 minutos en agitación suave y posteriormente se procedió a realizar dos lavados en una solución al 10 % de ácido acético de 20 minutos para retirar el exceso de colorante. Tras esta tinción, las áreas con actividad enzimática, aparecían como bandas claras con un fondo azul. Estos geles se escanearon con el densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y se determinó su cantidad con el software Quantity-One (Bio-Rad)¹⁹⁵.

7. Análisis del plasma

7.1 Bioquímica básica

El plasma humano se aisló de muestras de sangre extraídas en tubos EDTA dentro de las 2 horas desde la extracción. El plasma fue alicuotado y congelado a -80 °C. El perfil lipídico se determinó enzimáticamente usando un kit comercial para el analizador COBAS 6000 (Roche Diagnostics). El perfil lipídico incluye el colesterol total, triglicéridos, HDL-C, LDL y VLDL. El colesterol LDL y VLDL se calculó con la ecuación de Friedewald, exceptuando los casos con unos triglicéridos superiores a 3 mmol/L, donde los VLDL se separaron por ultracentrifugación acorde a las recomendaciones del *National Cholesterol Education Program* (NCEP).

7.2 Análisis de oxisteroles

La cuantificación de oxisteroles (24-hidroxicolesterol (HC); 25-HC; 27-HC; 7 α -HC; 7 β -HC y 7-KC) se hizo mediante cromatografía de

líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se evaluó el uso de distintas fuentes de ionización: ESI (*electrospray ionization*) y APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el centro de Ciencias Ómicas de Reus (*Center for Omics Science, COS*) (Reus, Tarragona, España). Siguiendo los protocolos descritos por Helmschrodt C y Mukhopadhyay^{162,196}.

El protocolo consiste, brevemente, en dos métodos, en el primero se cuantificó la cantidad de oxisteroles libres (7 – KC y 27 – HC) que contenía el estándar interno deuterado¹⁹⁶. El segundo cuantificaba el total de oxisteroles introduciendo un paso de saponificación^{161,162}. Al mismo tiempo se desarrolló una metodología de validación en LC-(APCI)-MS/MS por cada componente analizado. Los estándares de 7-β-HC, 25-HC y 7-KC se adquirieron en Sigma Aldrich, los estándares 24-S-HC y 27-HC se adquirieron en Enzo life Sciences (Farmingdale, NY, EUA) y el 7-KC-d7 en la casa comercial Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá).

7.3 ELISA

Los niveles circulantes de S100A4 y GDF15 en plasma de pacientes se midieron mediante la técnica ELISA (*Human protein S100A4 ELISA kit CusaBIO*, Houston, TX, USA, *Murine protein S100A4 ELISA kit CusaBIO*, Houston, TX, USA y *Human GDF15 Quantikine ELISA kit*, Minneapolis, MN, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante tanto para la metodología como para su posterior análisis.

8. Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron de estas metodologías se expresan como datos individuales, porcentajes o medias \pm las desviaciones estándar de la media (SD) o el error estándar de la mediana (ESM). El análisis estadístico para la comparación de dos grupos se realizó con la prueba t de Student o Mann - Whitney test dependiendo de si la prueba supera o no el test de normalidad ShapiroWilk respectivamente. En cuanto a la comparativa entre más de dos grupos se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) aplicando la corrección más estricta, la de Bonferroni o bien un test no - paramétrico Kruskal - Wallis utilizando la corrección de Dunn dependiendo nuevamente si pasaban o no el test de normalidad. Todos estos análisis estadísticos se realizaron con el programa *Graph Pad Prism* v6. Por otro lado, para el análisis de la correlación entre variables se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson, el análisis se realizó mediante el software de análisis estadístico R (www.r-project.org), los resultados se expresan utilizando la razón de momios e intervalos de confianza del 95%.

RESULTADOS

1. Resultados obtenidos en muestras de pacientes

1.1 Histología Básica de la aorta abdominal aneurismática

Las muestras de aorta abdominal procedentes de pacientes con aneurisma de aorta abdominal (AAA) y de donantes sanos, fueron estudiadas con técnicas de histología básica para analizar la estructura de la pared arterial (Fig. 8 y 9).

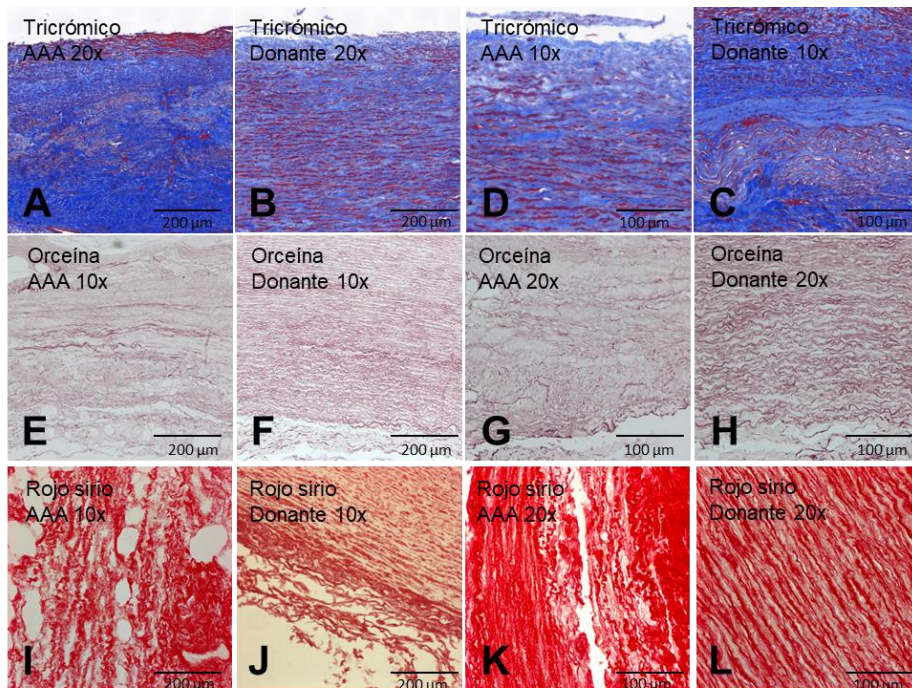


Figura 8. Histología básica de la aorta abdominal aneurismática. A-D) Imágenes representativas de secciones de aorta abdominal teñidas con tricrómico de Masson capturadas con los objetivos de 10x y 20x. E-H) Imágenes representativas de secciones de aorta abdominal teñidas con orceína mostrando la morfología de las fibras elásticas capturadas con los objetivos de 10x y 20x. I-L) Fotos representativas de secciones de aorta abdominal teñidas con rojo sirio capturadas con los objetivos de 10x y 20x.

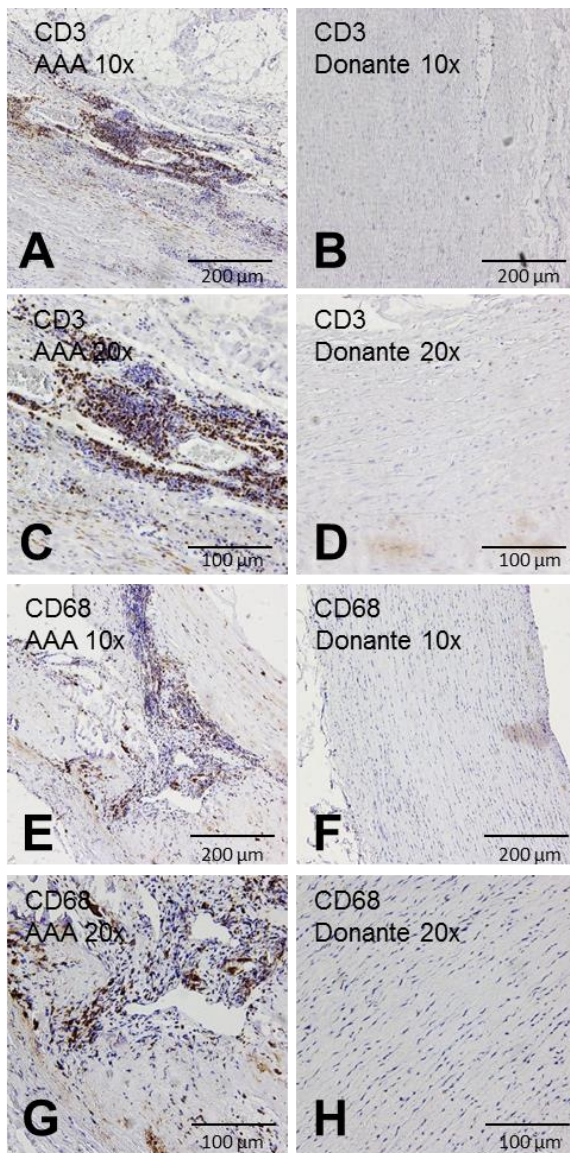


Figura 9. Inmunohistoquímica de células inmunes infiltradas en la pared de la aorta abdominal aneurismática. A-D) Fotos representativas mostrando la tinción con el marcador de linfocitos T CD3 captadas con los objetivos de 10x y 20x en secciones de aorta abdominal de pacientes (AAA) y de donantes. E-H) Fotos representativas mostrando la tinción con el marcador de macrófagos CD68 captadas con los objetivos de 10x y 20x en secciones de aorta abdominal de pacientes (AAA) y de donantes.

1.2 Los marcadores del estrés del retículo están inducidos en el AAA

Los datos clínicos y demográficos de las muestras de pacientes con AAA y de donantes incluidas en el estudio se recogen en la tabla 12.

	ARNm		Plasma	
	AAA	Donantes	AAA	Donantes
N	96	17	94	47
Edad (años)	70.9±6.5	60.9±13.4	71.0±6.7	59.3±4.3
Mujeres (% , N)	5.2 (5)	5.9 (1)	5.3 (5)	30 (14)
Diámetro aórtico (mm)	64.1±1.4	-	64.1±1.4	-
Dislipidemia (% , N)	63.5 (61)	17.6 (3)	64.9 (61)	-
HTC (% , N)	85.4 (82)	41.2 (7)	84.6 (80)	7.8
Diabetes (% , N)	22.9 (22)	29.4 (5)	23.4 (22)	-
Fumadores / ex-fumadores	83 (78)	41.2 (7)	82 (76)	9.8
Presión sistólica	139.8±19.3	-	139.8±19.3	-
FC(N=65)	73±11.6	-	73±11.6	-
Glucosa (mM, N=79)	5.9±1.3	-	5.5±0.9	-
CT (mM)	-	-	3.9±1.2	5.6±0.8
HDL-C (mM)	-	-	1±0.3	1.5±0.3
LDL-C (mM)	-	-	2.3±0.9	3.5±0.7
VLDL-C (mM)	-	-	0.6±0.3	0.6±0.3
Triglicéridos (mM)	-	-	1.3±0.7	1.4±0.7
EAP	47.9	0.0	48.4	-
ECV	9.4	11.8	15.4	-
IHD	24.0	0.0	27.5	-
EPOC	17.7	0.0	18.7	-
Antiplaquetario	59.4	11.8	62.6	-
Estatinas	69.8	5.9	68.1	1.8
NSAID	4.2	0.0	2.2	-
Corticoides	7.3	0.0	4.4	-
Inmunosupresores	4.2	0.0	3.3	-

Tabla 12. Datos clínicos y demográficos de la cohorte de pacientes utilizados en este estudio. Las variables nominales se muestran cómo %. Las variables continuas se muestran como media \pm SD. Debido a la procedencia de las aortas sanas algunos datos son desconocidos. FC, frecuencia cardiaca; ECV, enfermedad cerebrovascular; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTC, hipertensión crónica; TC, colesterol total; HDL-C, lipoproteínas de alta densidad; LDL-C, lipoproteína de baja densidad; EAP, enfermedad arterial periférica; ECI, enfermedad del corazón isquémico.

Los marcadores del estrés del retículo endoplasmático (RE) que forman parte de las tres vías de señalización activadas en respuesta al acúmulo de proteínas mal plegadas (*unfolding protein response* o *UPR*), se analizaron en aorta abdominal de pacientes con AAA y donantes. Los niveles de ARNm de IRE1, ATF6, XBP1 y DDIT3 estaban aumentados significativamente en la aorta aneurismática de los pacientes, mientras que no se observaron diferencias en la expresión de ATF4 y HSPA5 (Fig. 10 A-F) indicando una activación diferencial de las vías del *UPR* en el tejido aneurismático en una fase avanzada de la enfermedad. Adicionalmente estudiamos la expresión de dos genes cuya implicación en el estrés del RE ha sido recientemente descrita, CRELD2 y SEL1L1 (Fig. 10 G-H). La expresión génica de CRELD2 está regulada por ATF6 y hemos observado que su expresión también está aumentada en el AAA (Fig. 3 G). Por otro lado, los niveles de SEL1L1 también estaban aumentados (Fig. 10 H), indicando la activación del complejo de degradación de proteínas asociado al estrés del retículo (*ERAD*).

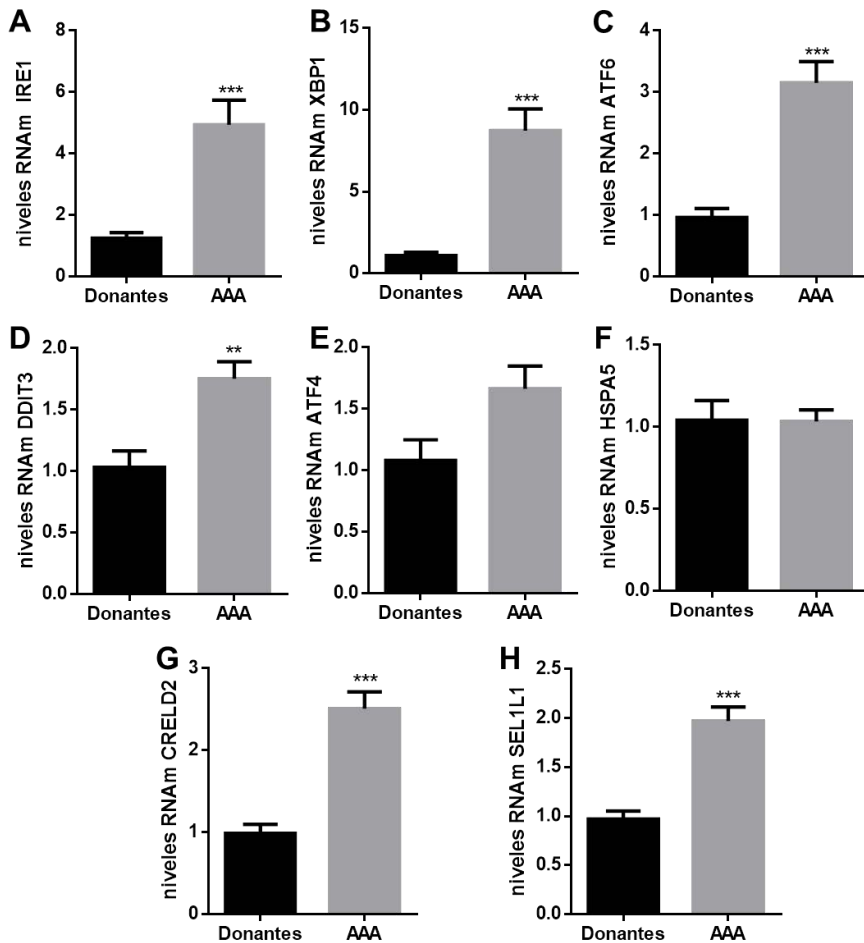


Figura 10. Los niveles de ARNm de algunos marcadores del estrés del RE se hallan inducidos en pacientes con AAA. A-H) Niveles de ARNm de IRE1, ATF6, XBP1, DDIT3, ATF4, HSPA5, CRELD2 y SEL1L1 analizados por PCR a tiempo real y normalizados con la expresión de β -actina en donantes (n=17) y pacientes (n=96). Los resultados se expresan como la media \pm ESM. **p<0.01 vs. AAA; ***p<0.001 vs. AAA.

Los niveles de proteína de los marcadores del estrés del RE que se encontraron aumentados se estudiaron mediante Western Blot y por inmunotinción. El incremento de expresión de los factores de transcripción XBP-1, ATF6 y CHOP se confirmó por Western blot (Fig. 11). El marcaje de XBP-1, ATF6 y CHOP se detectó en la capa media

de las muestras aneurismáticas por inmunofluorescencia, más específicamente en células CML como demuestra la co-tinción con α -actina (Fig. 12). En áreas de la aorta aneurismática con una gran infiltración de células inflamatorias, una co-tinción con CD3 reveló que ATF6 y XBP-1 también co-localizaban con linfocitos T (Fig. 13).

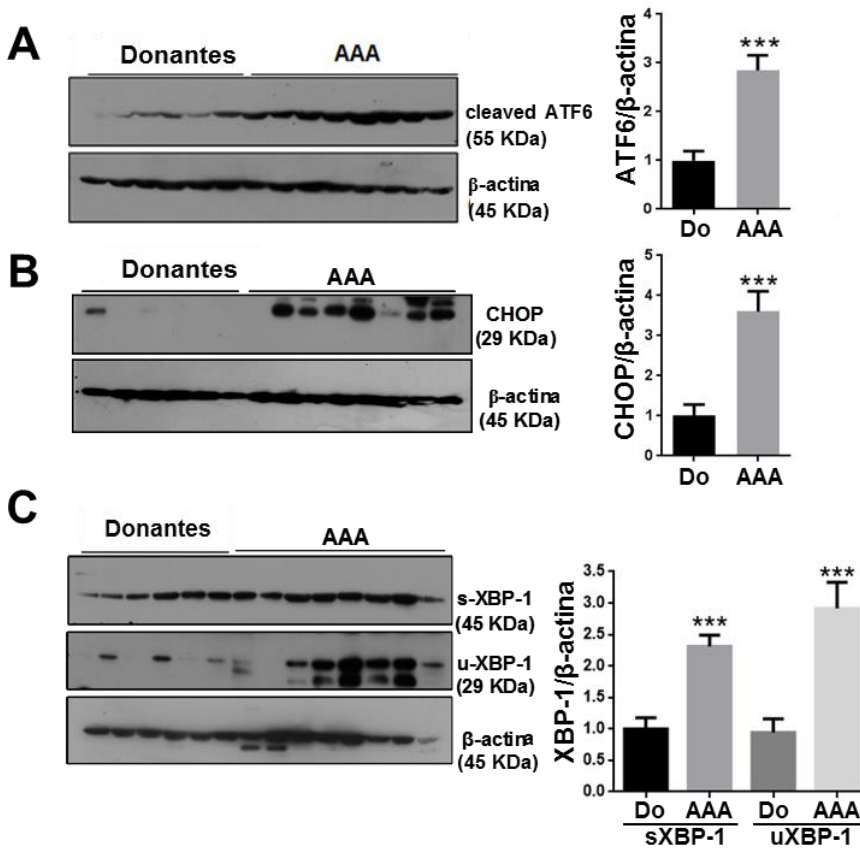


Figura 11. Aumento de la expresión de marcadores del estrés del RE en aneurisma de aorta abdominal humana. A-C) Western blot representativos analizando las proteínas ATF6 activada, CHOP, sXBP1 y uXBP1 (forma activa e inactiva respectivamente) junto con su correspondiente histograma cuantitativo (AAA: n=15 y Donantes: n=10). Los resultados se expresan como la media \pm ESM. **p<0.01 vs. AAA; ***p<0.001 vs. AAA.

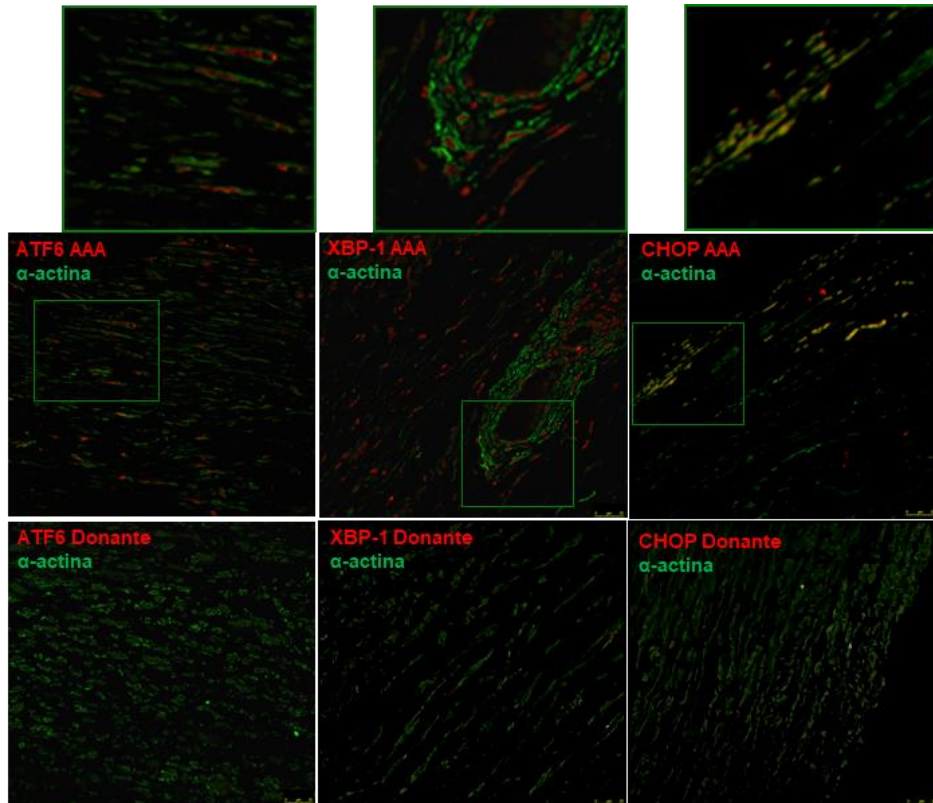


Figura 12. **Expresión de marcadores del estrés del RE en aneurisma de aorta abdominal humana.** Imágenes representativas de inmunofluorescencias realizadas en secciones aórticas contra ATF6, XBP-1 o CHOP (en rojo) y α -actina (en verde) analizados por microscopía confocal. Tal y como se indica en los paneles superiores se observan fotografías representativas de cortes procedentes de segmentos de aorta aneurismática de pacientes con AAA y en los paneles inferiores fotografías representativas procedentes de muestras de aorta abdominal sana de donantes (n=8-10; Escala 25 μ m).

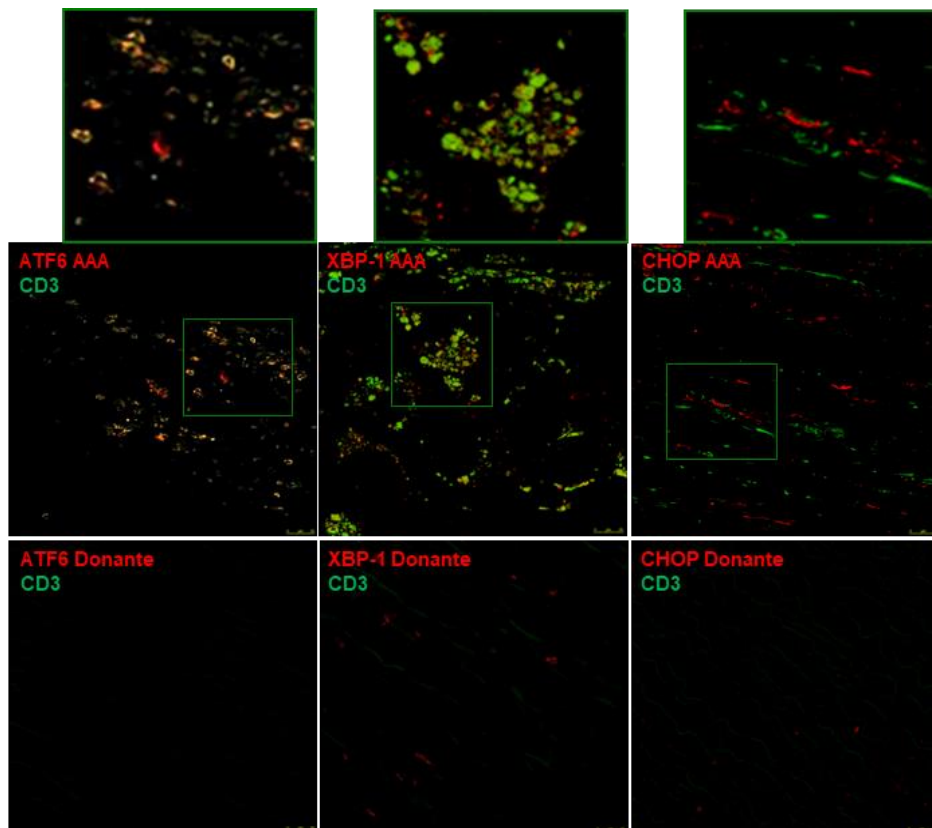


Figura 13. **Expresión de marcadores del estrés del RE en aneurisma de aorta abdominal humana.** Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia realizados en secciones aórticas para detectar expresión de ATF6, XBP-1 o CHOP (en rojo) en células positivas para CD3 (en verde) captada por microscopía confocal. Tal y como se indica en los paneles superiores se observan fotografías representativas de cortes de muestras de aorta aneurismática de pacientes con AAA y en los paneles inferiores fotografías representativas procedentes de muestras de aorta abdominal sana de donantes (n=8-10; Escala 25 μ m).

Para cuantificar apoptosis en la pared aórtica estudiamos la expresión de CHOP, como efector pro - apoptótico del UPR, detectando un aumento en tejido aneurismático junto con una elevación en células positivas para caspasa 3 activada mediante ensayos de inmunohistoquímica y un aumento en células apoptóticas detectadas mediante el ensayo de TUNEL (Fig. 14).

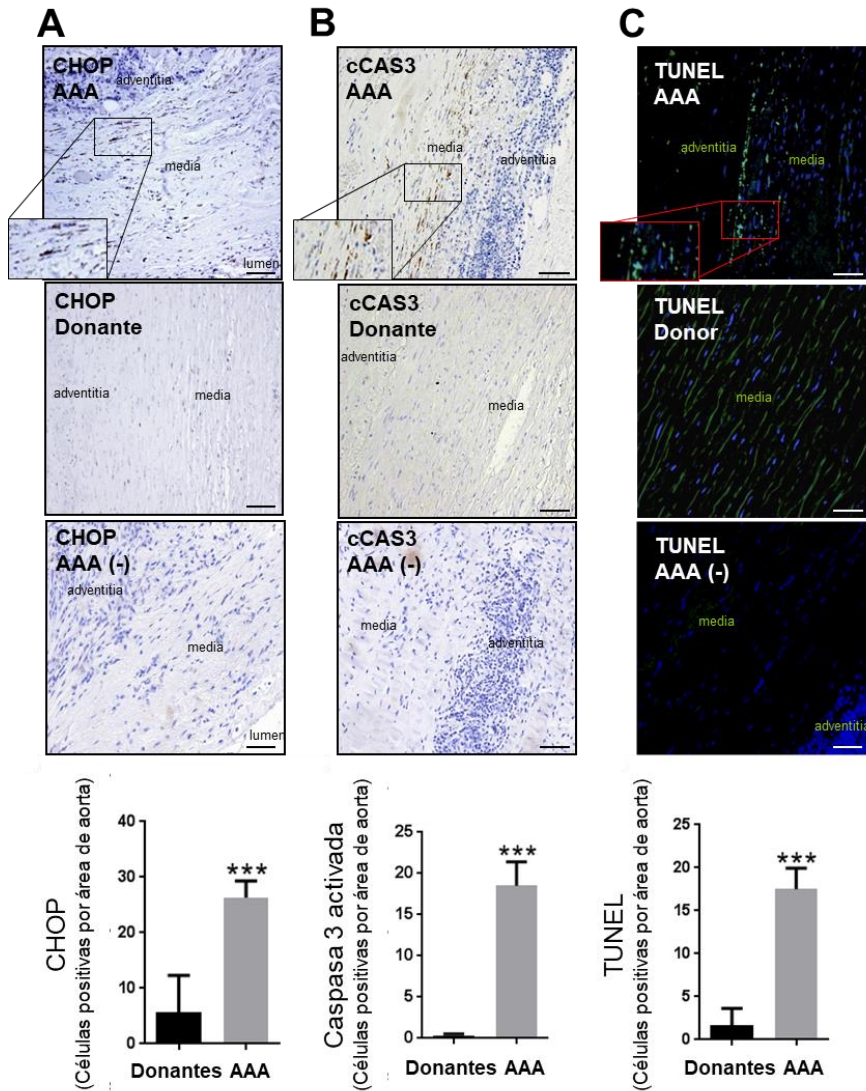


Figura 14. **Marcadores de apoptosis en aorta abdominal de pacientes con AAA y donantes sanos.** A-B) Imágenes representativas de IHC frente a CHOP y CAS3 activada (cCAS3) y su correspondiente histograma de cuantificación para células positivas en donantes y pacientes (AAA) (n=8-10). C) Imágenes representativas de TUNEL y su cuantificación en secciones parafinadas de aortas abdominales procedentes de pacientes y donantes (n=8-10). Los histogramas muestran la cuantificación del número positivo de células por área aórtica (20x). Los resultados se expresan como la media \pm ESM ** $p < 0.01$ contra AAA, *** $p < 0.001$ contra AAA.

1.3 Estudio del estrés oxidativo en la pared aórtica abdominal

La familia de las nicotinamidas adenina dinucleótido fosfato - oxidasas (NADPH oxidasas), es la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO), se hallan reguladas por mecanismos mecánicos, agentes vasoactivos (como la Ang II) y por el estrés del retículo¹⁴⁵. NOX2 y p22phox ARNm estaba aumentado, mientras que la expresión de NOX4 estaba disminuida y el NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2*) no cambiaba en pacientes con AAA comparado a los controles (Fig. 15 A-D). Adicionalmente se cuantificaron los niveles circulantes de ERO, observando un incremento en la producción total de ERO en pacientes con AAA respecto a donantes (Fig. 15 E).

Encontramos que la producción de anión superóxido estaba aumentada en secciones de aorta abdominal aneurismática preservada en OCT mediante tinción con la sonda fluorescente dihidroetidio (Fig. 16 A). La comunicación entre el RE y la mitocondria promueve la generación de ERO a nivel mitocondrial y la apoptosis (Thomas M, 2006). Por esta razón, estudiamos la posible generación de ERO derivadas de la actividad mitocondrial mediante la tinción de secciones de aorta abdominal preservadas en OCT con la sonda MitoSox Red, observándose un incremento en la producción de anión superóxido (Fig. 16 B). Para estudiar la masa mitocondrial en la pared aórtica, teñimos secciones de tejido preservado en OCT con la sonda MitoTracker Green. Observamos que la señal fluorescente entre las láminas de elastina es mayor en la aorta de donantes indicando una mayor masa mitocondrial (Fig. 16 C).

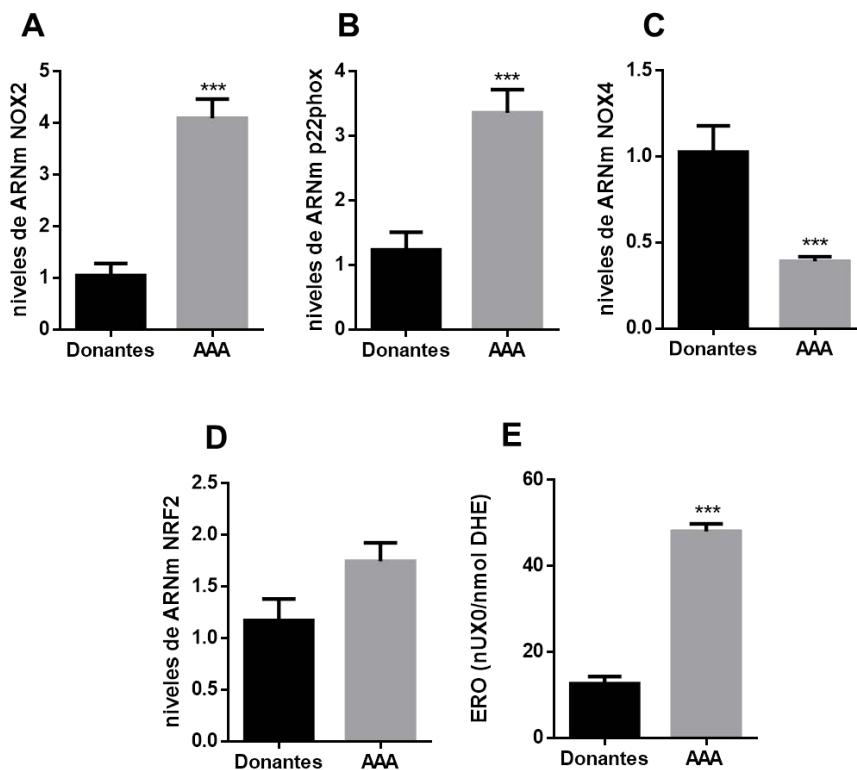


Figura 15. **El estrés oxidativo se halló exacerbado en el AAA.** A-D) Niveles de ARNm de NOX2, p22phox, NOX4 y NRF2 cuantificados por PCR a tiempo real normalizados por los niveles de ARNm de β -actina de donantes (n=17) y de pacientes de AAA (n=96). E) Niveles de ERO circulantes en plasma de AAA (n=78) y donantes (n=28). Los resultados se expresan como media \pm ESM. *** $p < 0.001$ vs. AAA.

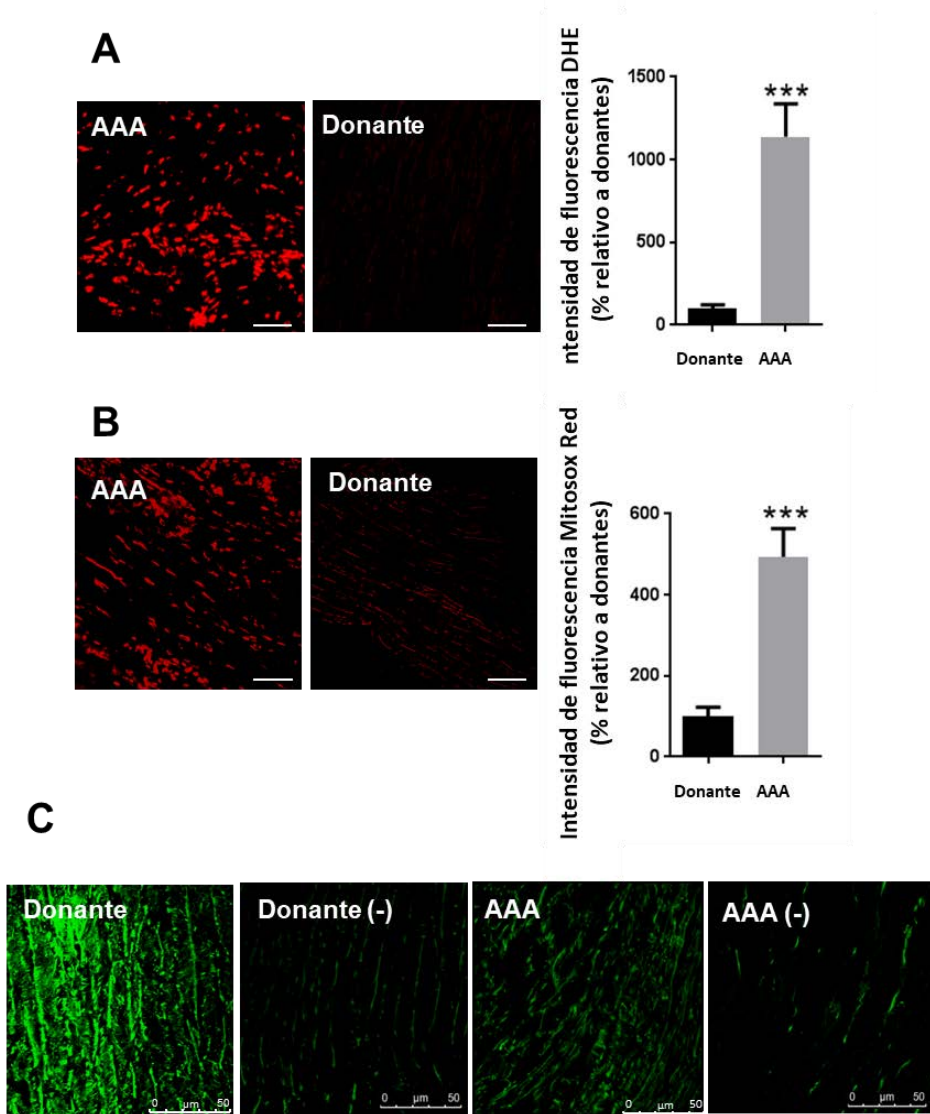


Figura 16. **El estrés oxidativo está aumentado en el AAA.** A-C) Secciones representativas de aorta abdominal de tejido congelado y preservado en OCT, teñidas con las sondas fluorescentes dihidroetidio (DHE) (A) o mitosox red (B). Los histogramas muestran la cuantificación de intensidad de fluorescencia correspondientes (n=10; escala 50 μm). C) Secciones representativas de aorta abdominal teñidas con Mitotracker green (n=10; escala 75 μm). Los resultados se expresan como la media ± ESM. *** p<0.001 vs. AAA.

1.4 Estudio de la biogénesis mitocondrial y del proceso de autofagia en el AAA

La biogénesis mitocondrial se determinó mediante el ratio de la expresión de Citocromo B (CytB) o de Citocromo C (CytC) entre la expresión de β -actina. Esta relación se utiliza como indicador de la biogénesis mitocondrial. Los resultados mostraron una clara reducción de la biogénesis mitocondrial en la aorta abdominal de pacientes con AAA en comparación con la de los donantes (Fig. 17 A-B). Además, la expresión de los genes relacionados con la biogénesis mitocondrial como PGC1 α , un regulador clave en la biogénesis mitocondrial, y sus genes dependientes: TFAM, un regulador de la transcripción, y NRF1 estaban considerablemente reducidos en pacientes de AAA en comparación con los donantes sanos. (Fig. 17 C-E).

Como la autofagia mitocondrial (mitofagia) juega un papel importante en el recambio mitocondrial, analizamos la expresión de marcadores de autofagia y mitofagia en lisados de tejido en pacientes de AAA y donantes. La expresión de DRP1 estaba disminuida mientras que la expresión de las proteínas LC3II, Beclin-1 y p62, tres reguladores clásicos del proceso de autofagia, se hallaron incrementadas en los pacientes con AAA comparado a los donantes. (Fig. 18).

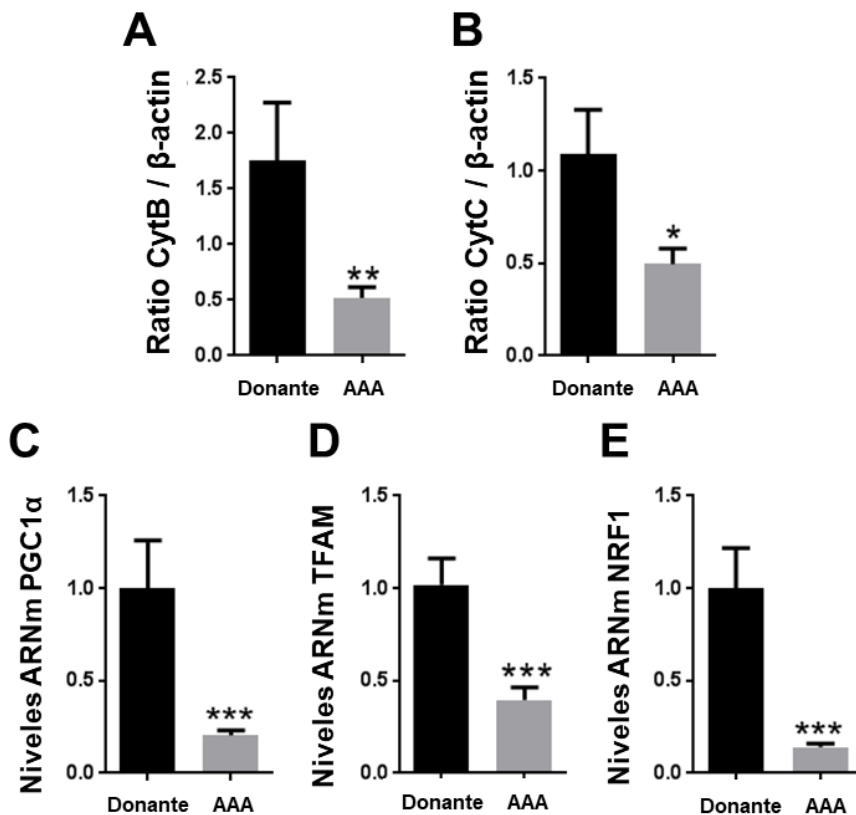


Figura 17. **Marcadores de biogénesis mitocondrial y mitofagia / autofagia en la aorta abdominal de donantes y pacientes con AAA.** A-B) Gráficas mostrando los ratios entre CytB o CytC y β -actina. C-E) Niveles de ARNm de PGC1 α , TFAM, y NRF1 analizados por PCR a tiempo real y normalizados por GAPDH en aorta abdominal de donantes (n=17) y pacientes de AAA (n=96). Los resultados se expresan como la media \pm ESM. **p<0.01 vs. AAA; *** p<0.001 contra AAA.

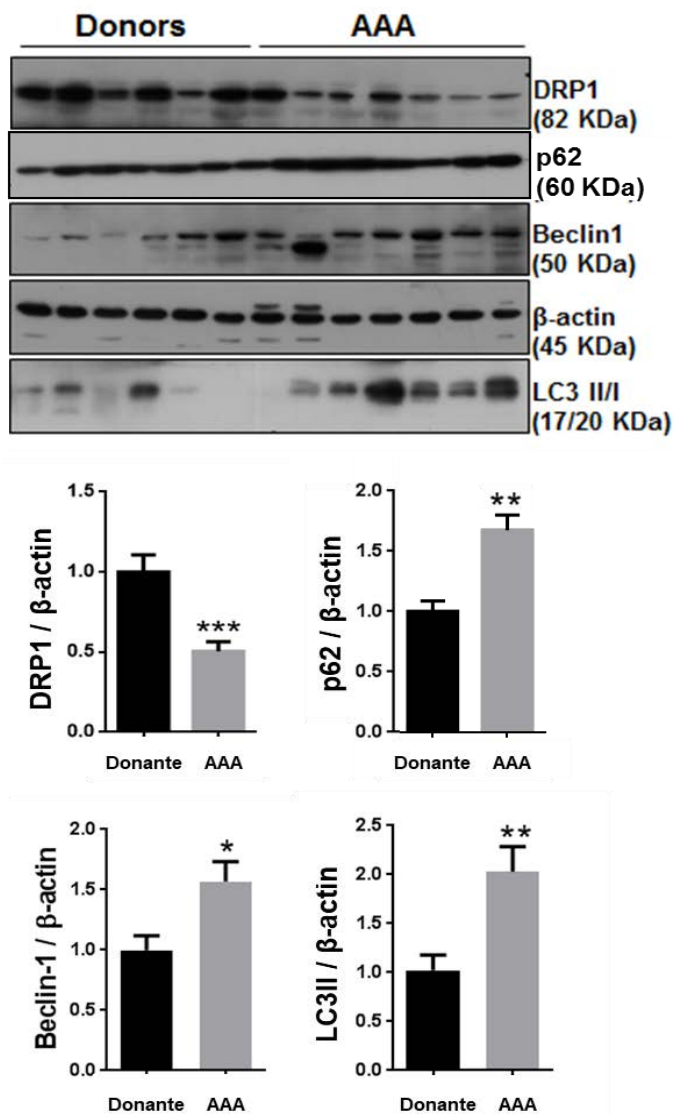


Figura 18. La expresión de proteínas implicadas en la biogénesis mitocondrial y mitofagia / autofagia se halló alterada en AAA. Western-blot representativo mostrando la expresión de DRP-1, p62, Beclin-1 y LC3II junto con los histogramas correspondientes a su cuantificación. (AAA: n=15, Donantes: n=10). Los resultados se expresan como la media \pm ESM. **p<0.01 vs. AAA; *** p<0.001 vs. AAA.

1.5 Marcadores circulantes en plasma

1.5.1 Los niveles de oxisteroles están alterados en el plasma de pacientes con AAA

El incremento de 7-cetocolesterol (7-KC) refleja un incremento del colesterol libre intracelular y un incremento del estrés oxidativo y además es un inductor reconocido del estrés del RE y de la apoptosis en células vasculares. Los oxisteroles han demostrado tener numerosos efectos que afectan la homeostasis del colesterol en células endoteliales, CML, macrófagos y linfocitos¹⁹⁷.

Los niveles de 7-KC libres y otros oxisteroles como 24S-hidroxicolesterol (24-S-HC), 25-hidroxicolesterol (25-HC), 27-hidroxicolesterol (27-HC), 7- β -hidroxicolesterol (7- β -HC) y 7- α -hidroxicolesterol (7- α -HC) se cuantificaron en el plasma de pacientes con AAA (n=94) y de donantes sanos (n=47). Observamos que los niveles de 7-KC estaban incrementados de forma significativa (Fig. 19 A), mientras que los niveles de 7- α -HC, 24(S)-HC y 27-HC, estaban reducidos significativamente en los pacientes respecto a los controles. (Fig. 19 C-E). Los niveles de 7- β -HC no se encontraron alterados (fig. 19 B) y los niveles de 25-HC fueron indetectables. Después de ajustar por la edad y por sexo, las diferencias en 7-KC, 24-S-HC y 7- α -HC se mantuvieron estadísticamente significativas. (Tabla 13)

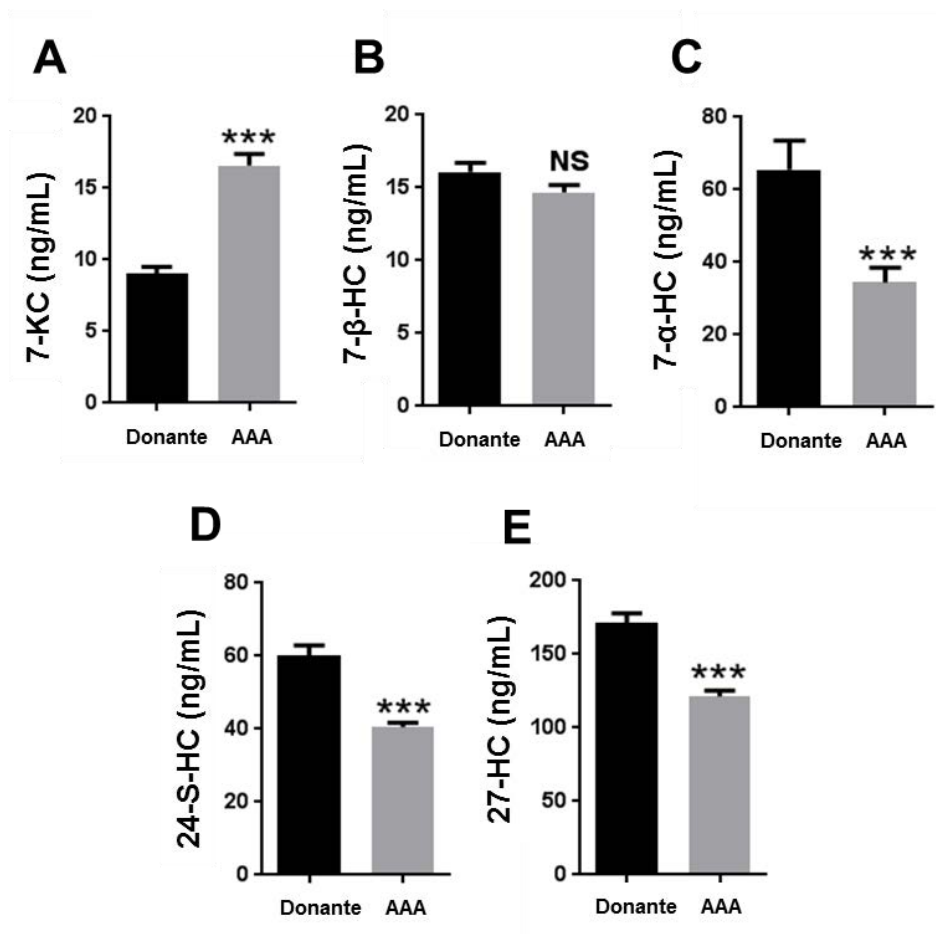


Figura 19. **Los niveles de oxisteroles están alterados en pacientes de AAA.** A-E) Los histogramas representan los valores de 7-KC, 7- α -HC, 7 β -HC, 24-HC, y 27-HC en ng / mL en plasma de donantes sanos y pacientes de AAA. Los resultados están expresados como la media \pm ESM. *** $p < 0.001$ vs. AAA.

	OR (95% CI)	P-valor
7-KC	1.317 (1.176-1.475)	0.000001*
Edad	1.325 (1.121-1.565)	0.001*
Sexo	1.318 (1.165-1.491)	0.00001*
Todos los factores	1.320 (1.117-1.560)	0.001*
7 α -HC	0.980 (0.968-0.992)	0.001*
Edad	0.987 (0.975-1.00)	0.045*
Sexo	0.979 (0.966-0.992)	0.002*
Todos los factores	0.987 (0.974-1.00)	0.050*
27-HC	0.902 (0.858-0.948)	0.000048*
Edad	0.953 (0.893-1.017)	0.149
Sexo	0.910 (0.865-0.957)	0.00021*
Todos los factores	0.968 (0.906-1.035)	0.343
24-S-HC	0.926 (0.898-0.955)	0.0000007*
Edad	0.904 (0.857-0.953)	0.00019*
Sexo	0.930 (0.901-0.960)	0.000009*
Todos los factores	0.902 (0.853-0.954)	0.0003*

Tabla 13. **Estadística de los niveles de oxisteroles tras el ajuste por factores de confusión.** Razón de probabilidades (*Odds Ratio*); 95% IC: 95. * $p < 0.05$ vs. Donantes.

A continuación estudiamos si los niveles de los diferentes oxisteroles correlacionaban con los niveles de colesterol total (TC), colesterol HDL (HDL-C) y colesterol LDL (LDL-C) en el plasma de los pacientes y donantes sanos (tabla 14).

Los estudios de correlación entre oxisteroles y lípidos (TC, HDL-C, LDL-C, TG y VLDL-C) mostraron que existía una asociación entre los niveles altos de 24-S-HC y 27-HC y los niveles del CT en pacientes con AAA, mientras que sólo los niveles de 24-S-HC se asociaron con el grupo HC. El colesterol LDL-C se asoció con niveles altos de 24-S-HC en el plasma de donantes y pacientes, y con niveles altos de 27-HC en pacientes pero no en donantes.

Los niveles altos de HDL-C se asociaron significativamente con los niveles de los oxisteroles 24-S-HC y 7- α -HC en los pacientes aneurismáticos. Además, los niveles de los oxisteroles 24-S-HC y 27-HC también se asociaron significativamente con TG y VLDL-C en pacientes pero no en controles. Ninguno tipo de colesterol se asoció significativamente con los niveles de 7-KC en ninguno de los dos grupos. Los niveles de 7-KC en plasma de pacientes de AAA se correlacionaron con la expresión génica de IRE1, ATF6 y CHOP en tejido (Fig. 20 A-C). También se asoció los niveles de 7-KC circulante con la expresión local de las subunidades de NADPH oxidasa en pacientes de AAA (Fig. 20 D-E).

Variable	AAA vs DS	n	7-KC	24-S-HC	27-HC	7 α -HC
CT (mmol/L)	AAA	94	-0.0323 (P<0.7573)	0.5762 (P<0.0001)	0.4627 (P<0.0001)	0.1711 (P<0.1010)
	DS	47	0.07300 (P<0.6258)	0.5470 (P<0.0001)	0.03066 (P<0.8379)	-0.0715 (P<0.6326)
HDL-C (mmol/L)	AAA	94	-0.0023 (P<0.9825)	0.2976 (P<0.0036)	0.1385 (P<0.1832)	0.2294 (P<0.027)
	DS	47	0.07150 (P<0.6330)	0.1355 (P<0.3637)	0.2013 (P<0.1749)	-0.0193 (P<0.8974)
LDL-C (mmol/L)	AAA	94	-0.0145 (P<0.8896)	0.5730 (P<0.0001)	0.4839 (P<0.0001)	0.1003 (P<0.3388)
	DS	47	0.07491 (P<0.6168)	0.5590 (P<0.0001)	-0.04272 (P<0.7756)	-0.0663 (P<0.6577)
TG (mmol/L)	AAA	94	-0.0842 (P<0.4197)	0.2828 (P<0.0057)	0.2699 (P<0.0085)	0.1322 (P<0.2066)
	DS	47	-0.03966 (P<0.7913)	0.1003 (P<0.5024)	-0.008408 (P<0.9553)	-0.0260 (P<0.8621)
VLDL-C (mmol/L)	AAA	94	-0.0819 (P<0.4326)	0.2856 (P<0.0053)	0.2698 (P<0.0085)	0.1328 (P<0.2046)
	DS	47	-0.03609 (P<0.8097)	0.1011 (P<0.4988)	-0.01043 (P<0.9445)	-0.0266 (P<0.8591)
AA diámetro	AAA	94	-0.191 (P<0.15)	-0.119 (P<0.246)	-0.196 (P<0.107)	-0.129 (P<0.208)

Tabla 14. Valores de correlación entre los diferentes oxisteroles y niveles de colesterol en donantes sanos y pacientes de AAA. DS: Donantes sanos; AAA: pacientes con aneurisma; KC: cetocolesterol; HC: Hidroxicolesterol; CT: colesterol total; HDL-C: lipoproteína de alta densidad; LDL-C: lipoproteína de baja densidad. El coeficiente de correlación de Pearson (r) se muestra junto con la significancia estadística.

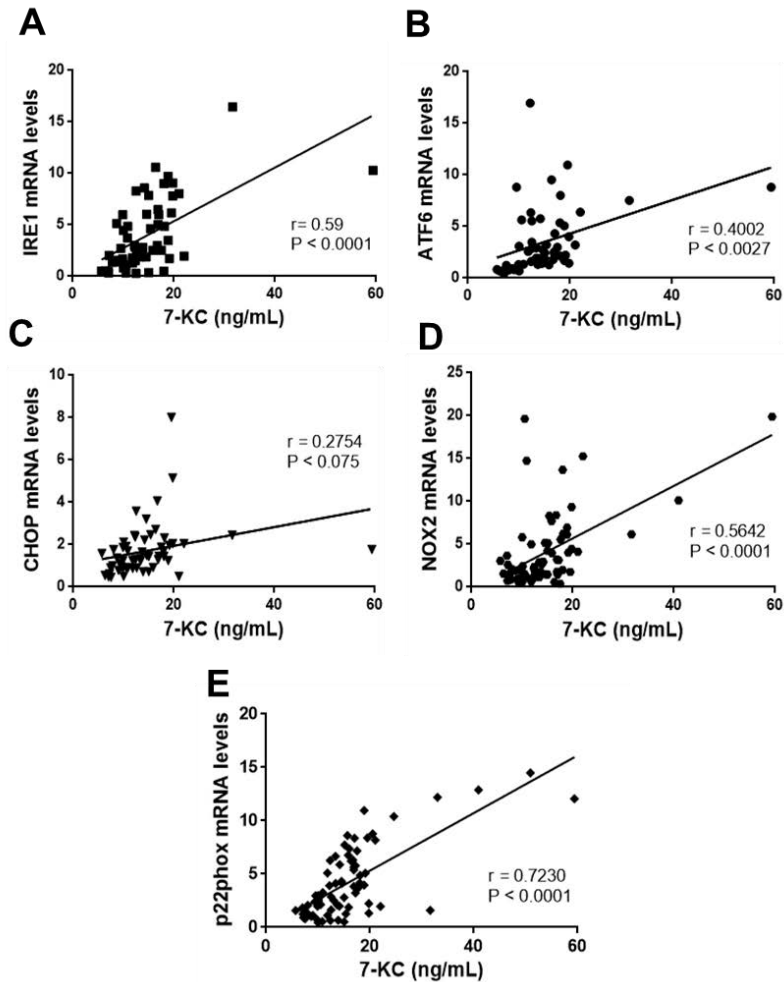


Figura 20. Gráficas de correlaciones establecidas entre los niveles circulantes de 7-KC de pacientes y la expresión génica de marcadores del estrés del RE y de estrés oxidativo en el tejido aneurismático de los mismos. A-C) Los gráficos muestran la correlación entre los niveles de ARNm de IRE1, ATF6 y CHOP con los niveles de 7-KC en pacientes de AAA (n=75). D-E) Los gráficos muestran la correlación entre los niveles de ARNm de NOX o p22phox con los niveles de 7-KC en pacientes de AAA (n=78). La r y la significancia estadística se calcularon a través del coeficiente de correlación de Pearson.

1.5.2 Los niveles circulantes de GDF15 y S100A4 se encuentran alterados en los pacientes con AAA.

La forma soluble del factor de crecimiento GDF15, que juega un papel preponderante en las vías reguladoras de la inflamación y se ha relacionado con la apoptosis, reparación celular y crecimiento celular, ha demostrado ser un marcador con valor pronóstico en pacientes con enfermedades cardiovasculares¹⁹⁸⁻²⁰². En nuestra cohorte de pacientes hemos observado que los niveles de GDF15 se encuentran significativamente elevados respecto a los donantes y se asocian con el diámetro aórtico y con la edad de los pacientes (Fig. 21).

Por otro lado S100A4, una proteína relacionada con la remodelación de la pared media de la aorta, por cuanto interviene en la regulación de la inducción y migración de CMLs a través de la activación de NF- κ B²⁰³. Hemos observado que tanto los niveles circulantes como la expresión de S100A4 en tejido están disminuidos significativamente respecto a los donantes. No encontramos asociación entre los niveles circulantes de S100A4 y el diámetro del aneurisma en los pacientes aunque sí observamos una débil correlación negativa con la edad de todos los sujetos (donantes y pacientes) incluidos en nuestro estudio. (Fig. 22)

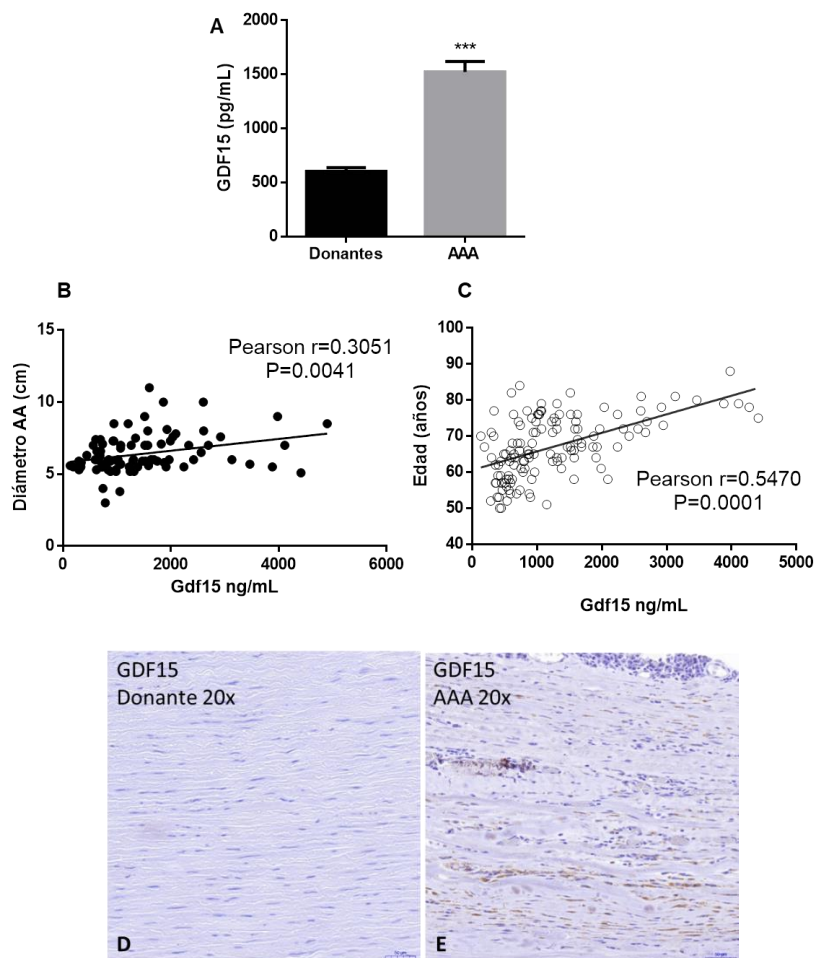


Figura 21. Los niveles de GDF15 están aumentados en los pacientes con AAA respecto los donantes y correlacionan con los datos de diámetro aórtico y edad. A) Niveles de proteína GDF15 soluble en plasma de pacientes y donantes (pg/mL). B-C) Gráfica de correlación entre los niveles de GDF15 y el diámetro aórtico (B) y edad de los pacientes (C). $n=42$ (donantes) $n=96$ (AAA), la significancia estadística se estableció mediante un test de student (A) y a través del análisis de correlación se obtuvo el coeficiente de Pearson (B-C). D-E) Fotos representativas de secciones de aorta abdominal parafinada captadas con el objetivo de 20x de mostrando la expresión de GDF15 en la pared arterial de donantes y pacientes ($n=8-10$).

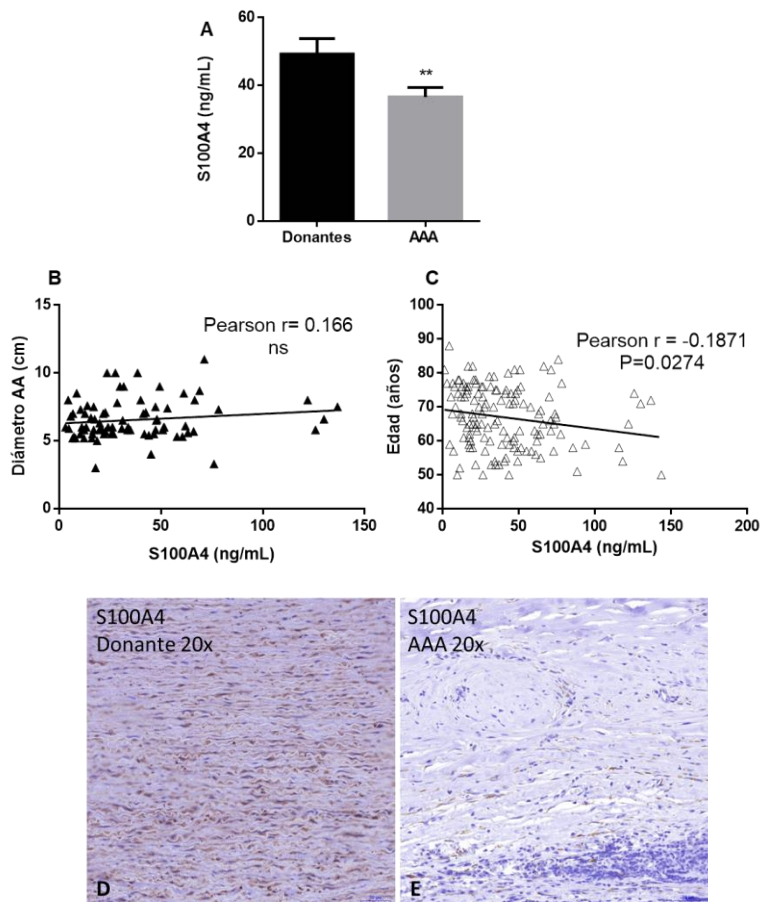


Figura 22. Los niveles de S100A4 circulante se hallaron reducidos en los pacientes con AAA respecto los donantes A) Niveles de proteína S100A4 en plasma de pacientes y donantes (ng/mL). B-C) Correlación de los niveles de S100A4 con el diámetro aórtico (B) y con la edad de los pacientes (C). $n=42$ (donantes) $n=96$ (AAA), la significancia estadística se estableció mediante un test de student (A) y a través del análisis de correlación se obtuvo el coeficiente de Pearson (B-C). D-E) Fotos representativas de secciones de aorta abdominal parafinada captadas con el objetivo de 20x de mostrando la expresión de S100A4 en la pared arterial de donantes y pacientes ($n=8-10$).

1.6 La exposición a 7-KC activa el estrés del RE, el estrés oxidativo y altera la biogénesis mitocondrial.

En experimentos preliminares de apoptosis las CMLs se incubaron a diferentes concentraciones de 7-KC, 15 y 30 μM durante 24 y 48 h, tal y como se describió anteriormente en la literatura^{204,205}. Observamos que la concentración más alta de 7-KC era muy tóxica tras 24 h de incubación. Por esta razón, los ensayos de apoptosis y expresión génica se realizaron con la dosis más baja testada, 15 μM . Para los ensayos de apoptosis ayunamos las células durante 18 h antes de añadir el 7-KC durante 24 h, el porcentaje de células sanas, apoptosis temprana, apoptosis tardía y células necróticas se midió por citometría de flujo (Fig. 23)

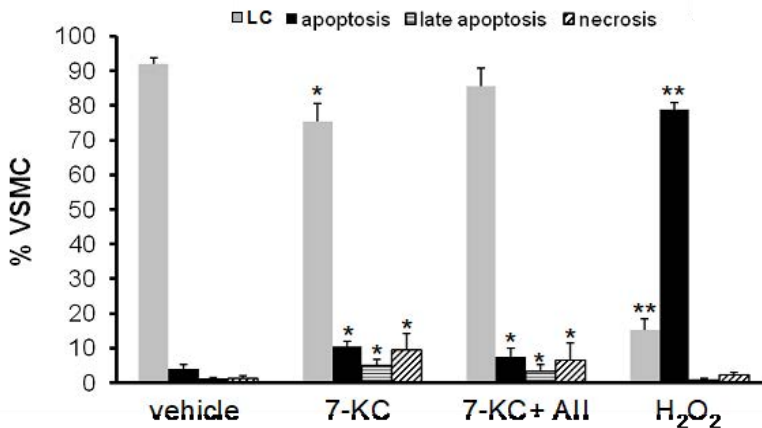


Figura 23. **Apoptosis inducida por exposición a 7-KC.** Las CMLs fueron expuestas a 7-KC (15×10^{-6}) durante 24 h en presencia o ausencia de Ang II (10^{-7} M). En el histograma se representa el porcentaje de células vivas (LC), el de células en fase de apoptosis temprana (apoptosis), el porcentaje de células en apoptosis tardía y de células necróticas. Los valores se muestran como la media \pm ESM (n=4; *p<0.01 vs. vehículo; # p<0.05 vs. 7-KC).

Por otro lado las células se expusieron a 7-KC durante 24 h para analizar la inducción del estrés del RE y la biogénesis mitocondrial. Se estudió la expresión génica de los siguientes marcadores: ATF4, ATF6, CHOP, HSPA5, ERN1, SEL1L y CREB1 observándose una inducción significativa en todos ellos. Cuando los cultivos se co-incubaron con Ang II durante 48 h para estudiar sus efectos como péptido vasoactivo, la expresión de HSPA5, ERN1 y CHOP se vio potenciada, sugiriendo un efecto sinérgico. (Fig. 24)

Adicionalmente, se estudió si la biogénesis mitocondrial estaba alterada en las CML tratadas con 7-KC y si la co - incubación con Ang II la afectaba o no. Se observó un descenso en la expresión de PGC1 α y TFAM, mientras que los niveles de NRF1 no se vieron reducidos significativamente con el tratamiento de 7-KC (Fig. 25 A-B). La exposición a 7-KC incrementó además los niveles de MMP2 y IL-1 β (Fig. 25 C-D). La co-incubación con Ang II no modificó los efectos que producía el 7-KC en los marcadores de la biogénesis mitocondrial (Fig. 25). En la literatura se ha descrito que el 7-KC genera estrés oxidativo en células vasculares^{204,206}. En otra tanda de experimentos con CMLs estudiamos si la producción de ERO contribuía a la inducción por 7-KC de los marcadores estudiados mediante la pre-incubación con los antioxidantes Tempol y NAC. Observamos que ambos atenuaban la expresión de diversos marcadores del estrés endoplasmático y oxidativo en respuesta a 7-KC (Fig. 26).

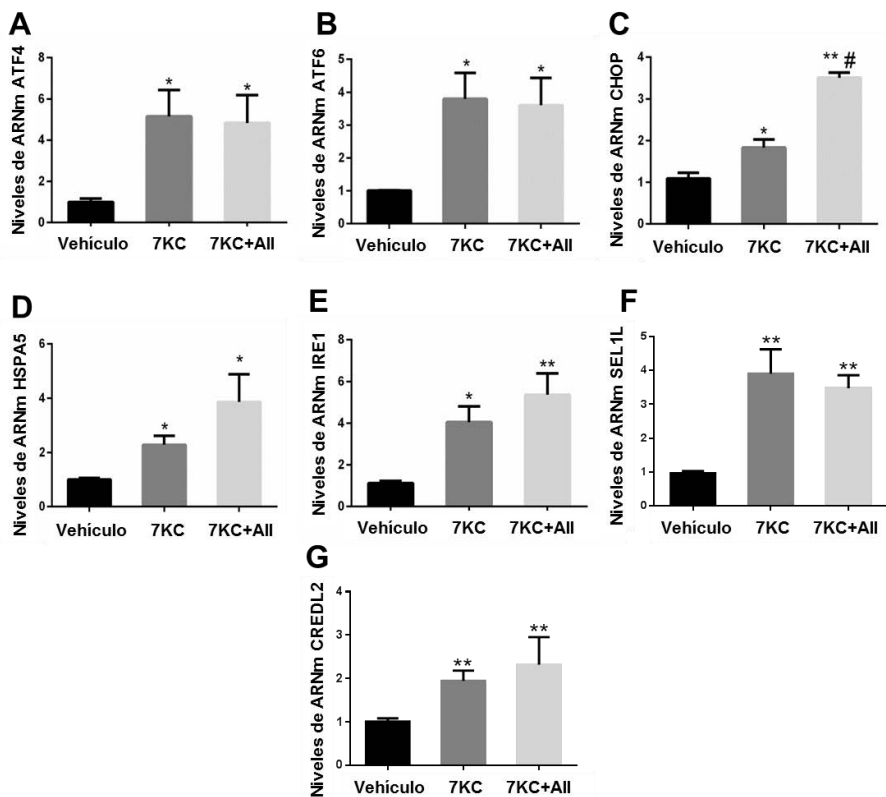


Figura 24. La exposición a 7-KC induce el estrés del RE en CMLs humanas y la co-incubación con Ang II tiene un efecto sinérgico. A-G) Niveles de ARNm de ATF4, ATF6, CHOP, HSPA5, ERN1, SEL1L y CREDL2 normalizados con GAPDH en CMLs estimuladas con 7-KC (15×10^{-6} M) durante 24 en presencia o ausencia de Ang II (10^{-7} M). Los valores se muestran como la media \pm ESM ($n=6$; * $p < 0.01$ vs vehículo; # $p < 0.05$ vs 7-KC).

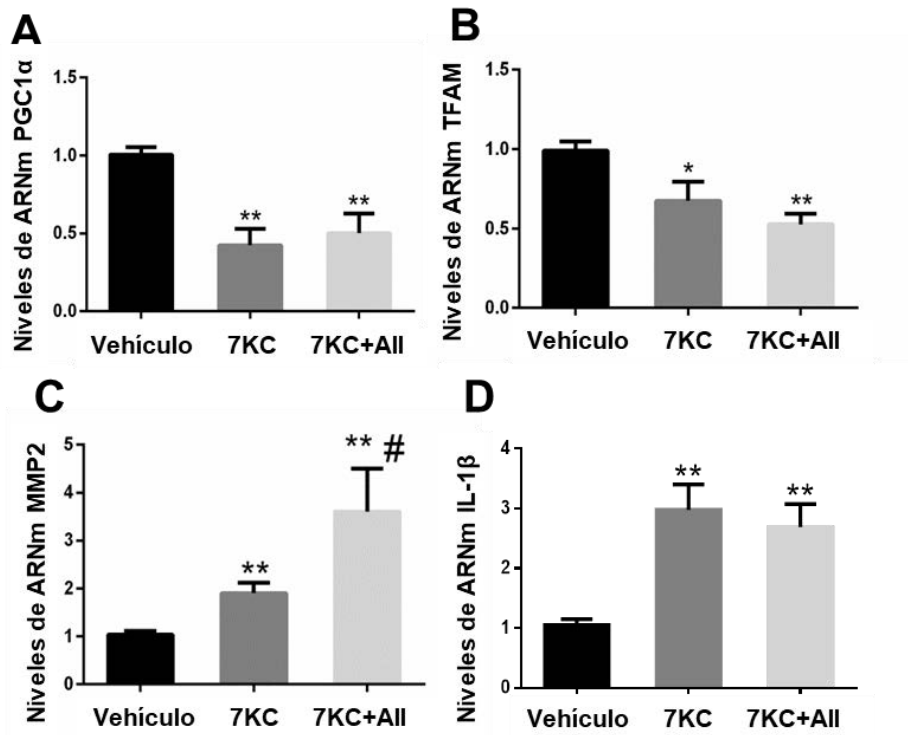


Figura 25. La exposición a 7-KC reduce la expresión de indicadores de la biogénesis mitocondrial e induce la expresión de MMP2 e IL-1β en CMLs humanas. A-D) Niveles de ARNm de PGC1α, TFAM, MMP2 e IL-1β normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH en CMLs estimuladas con 7-KC (15×10^{-6} M) durante 24 h en presencia o ausencia de Ang II (10^{-7}). Los valores se muestran como la media \pm ESM (n=6; *p<0.01 vs vehículo; # p<0.05 vs 7-KC).

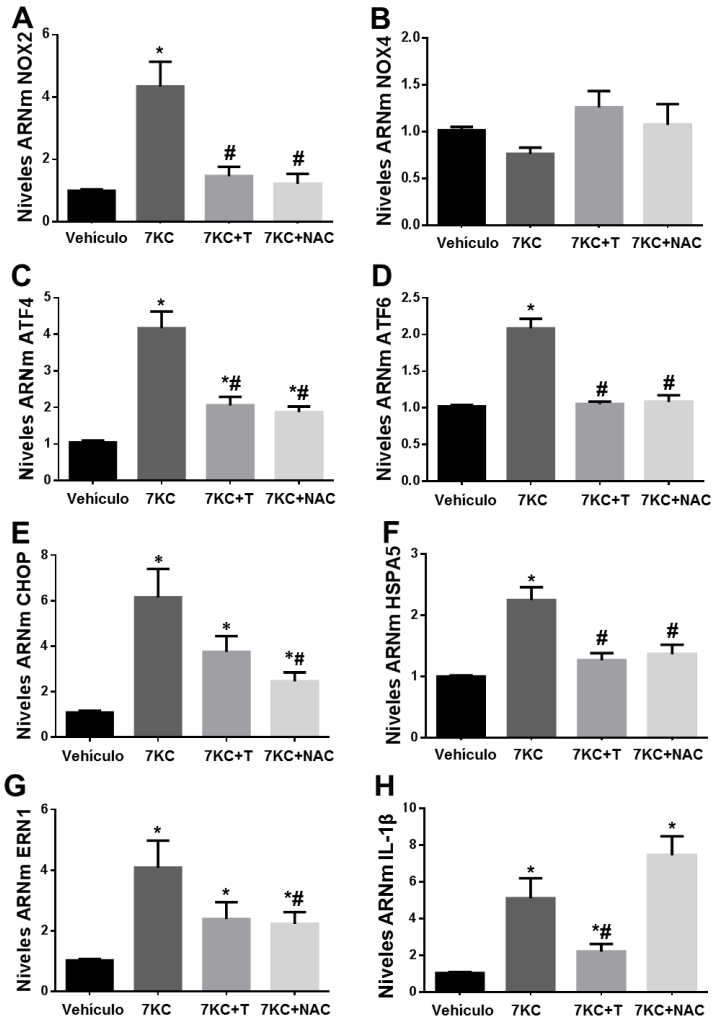


Figura 26. La preincubación con los antioxidantes Tempol y N-acetilcisteína protege frente a la respuesta a 7-KC. Niveles de ARNm de NOX2, NOX4, ATF4, ATF6, CHOP, HSPA5, IRE1 y IL-1 β normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH en CMLs estimuladas con 7-KC (15×10^{-6} M) durante 24 h preincubadas o no con Tempol (10^{-6} M) o NAC (10 mM) durante 24 h. Los valores se muestran como la media \pm ESM (n=6; *p<0.01 vs vehículo; # p<0.05 vs 7-KC).

2. Resultados obtenidos en modelo murino

2.1 Histología Básica

Las muestras de aorta abdominal murina procedente de todos los grupos, fueron estudiadas mediante técnicas de histología clásica para analizar su estructura (Fig. 27).

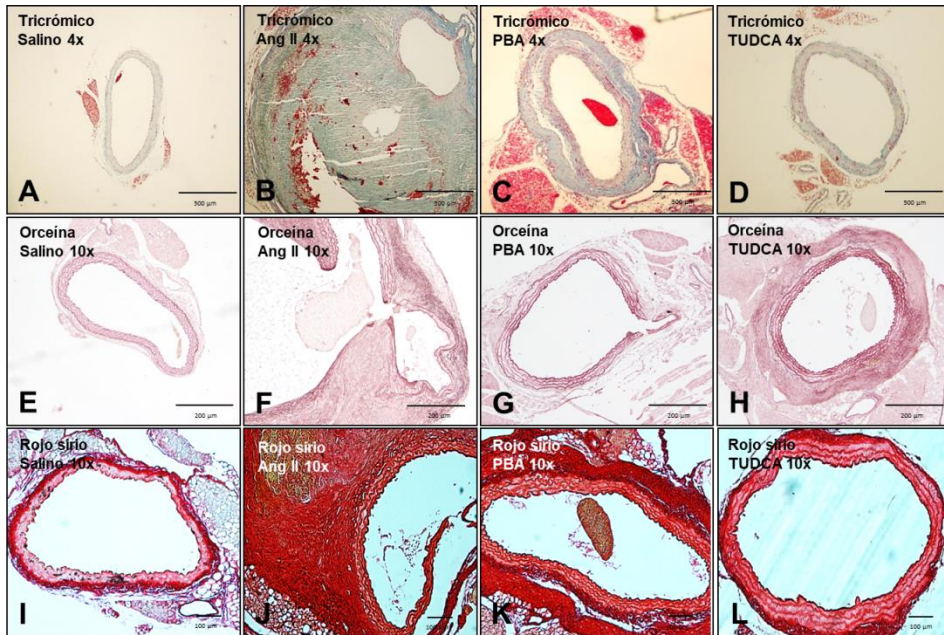


Figura 20. **Histología básica.** A-D) Cortes representativos de aortas abdominales murinas procedentes de ratones de los diferentes grupos en estudio teñidas con tricrómico de masson; E-H) orceína y I-L) con rojo sirio. Las imágenes fueron captadas con el objetivo de 4x y 10x.

2.2 El diámetro aórtico se encuentra reducido en los ratones tratados con TUDCA y PBA

El efecto de los inhibidores del estrés del RE en la formación del aneurisma se estudió en el modelo murino $\text{ApoE}^{-/-}$ infundido con Ang II. El diámetro de la aorta abdominal de los animales pertenecientes a los diferentes grupos de estudio (Salino, Ang II, PBA y TUDCA) fue monitorizado mediante ultrasonografía a día 0, 3, 7, 14, 21 y día 28, coincidiendo este último con el punto final del estudio. El diámetro aórtico se cuantificó en imágenes capturadas de vídeos tanto en plano tanto sagital como transversal (Fig. 28). A continuación se muestran las figuras de la evolución del diámetro aórtico a diferentes días y a punto final (día 28) (Fig. 29 A-B).

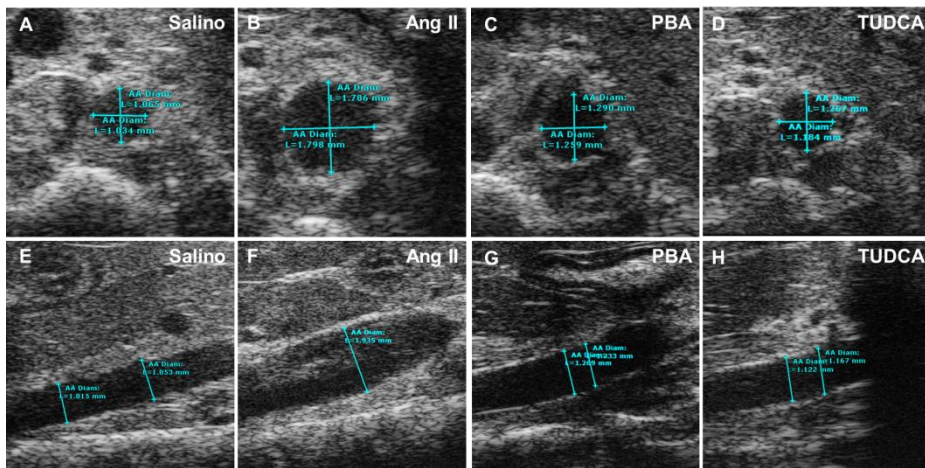


Figura 28. **Imágenes representativas de ultrasonografía de alta frecuencia.** Las imágenes fueron captadas a nivel de la aorta suprarrenal en plano transversal y longitudinal de videos y analizadas en los diferentes grupos experimentales de animales. A-D) Plano transversal E-H) Plano sagital. de izquierda a derecha: Salino, Ang II, PBA y TUDCA

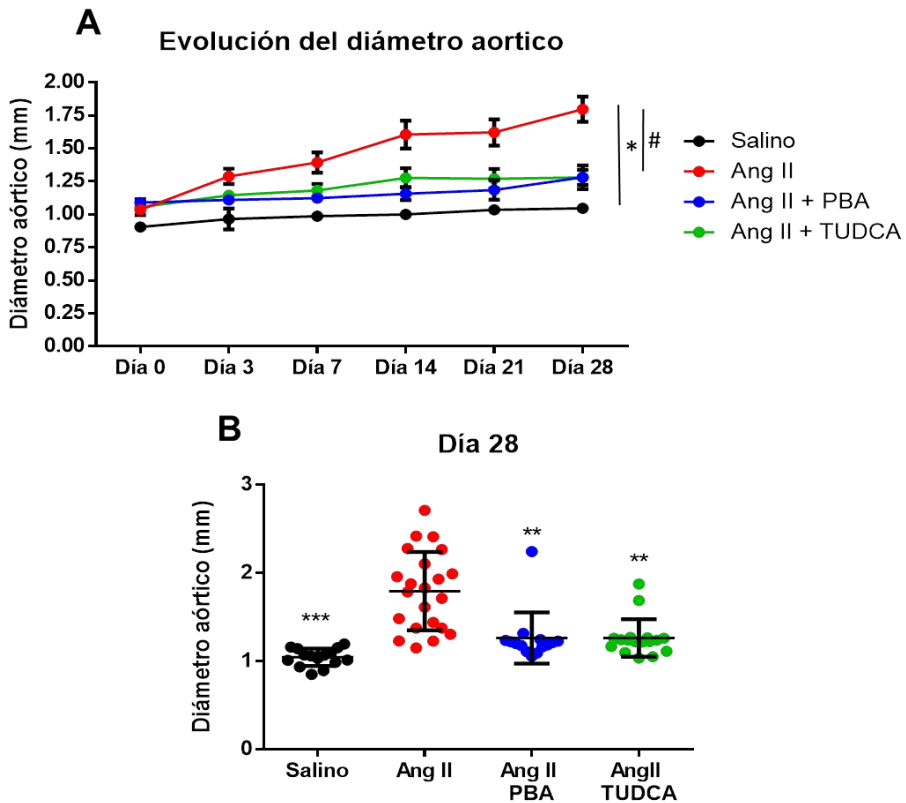


Figura 29. La progresión del aneurisma de aorta abdominal (AAA) se vio reducido con el tratamiento con los inhibidores clásicos del estrés del RE, PBA y TUDCA. Los ratones ApoE^{-/-} fueron infundidos con salino o Ang II y fueron tratados o no con TUDCA o PBA durante 28 días. A) El gráfico muestra la evolución del diámetro aórtico (mm) durante las 4 semanas de tratamiento, medido por ultrasonografía. B) Diámetro aórtico (mm) a día 28 medido por ultrasonografía. Los datos están expresados como media \pm ESM * $p < 0.05$ vs salino.

2.3 El tratamiento los inhibidores del estrés del RE incrementa la supervivencia y reduce la incidencia de formación de AAA en los ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II.

La supervivencia de los ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II y tratados con TUDCA fue mayor que en aquellos animales tratados con PBA. La supervivencia de los ratones tratados con PBA fue similar a la observada en los ratones del grupo problema pero observamos un retraso de los eventos de muerte durante el tiempo de infusión con Ang II (Fig. 30 A).

En nuestro estudio cuantificamos la incidencia de formación del aneurisma abdominal de aorta en ambos sexos y en los diferentes grupos de ratones tratados. La incidencia varió de forma significativa entre machos y hembras, siendo del 90% en los primeros, significativamente más elevada que en las hembras (Fig. 30 B-D).

En la figura 30 se muestran fotos representativas de aortas fijadas de cada grupo en las que es posible apreciar a nivel macroscópico el remodelado aórtico generado en nuestro modelo murino y el efecto beneficioso de la administración de los fármacos (Fig. 30 E-F)

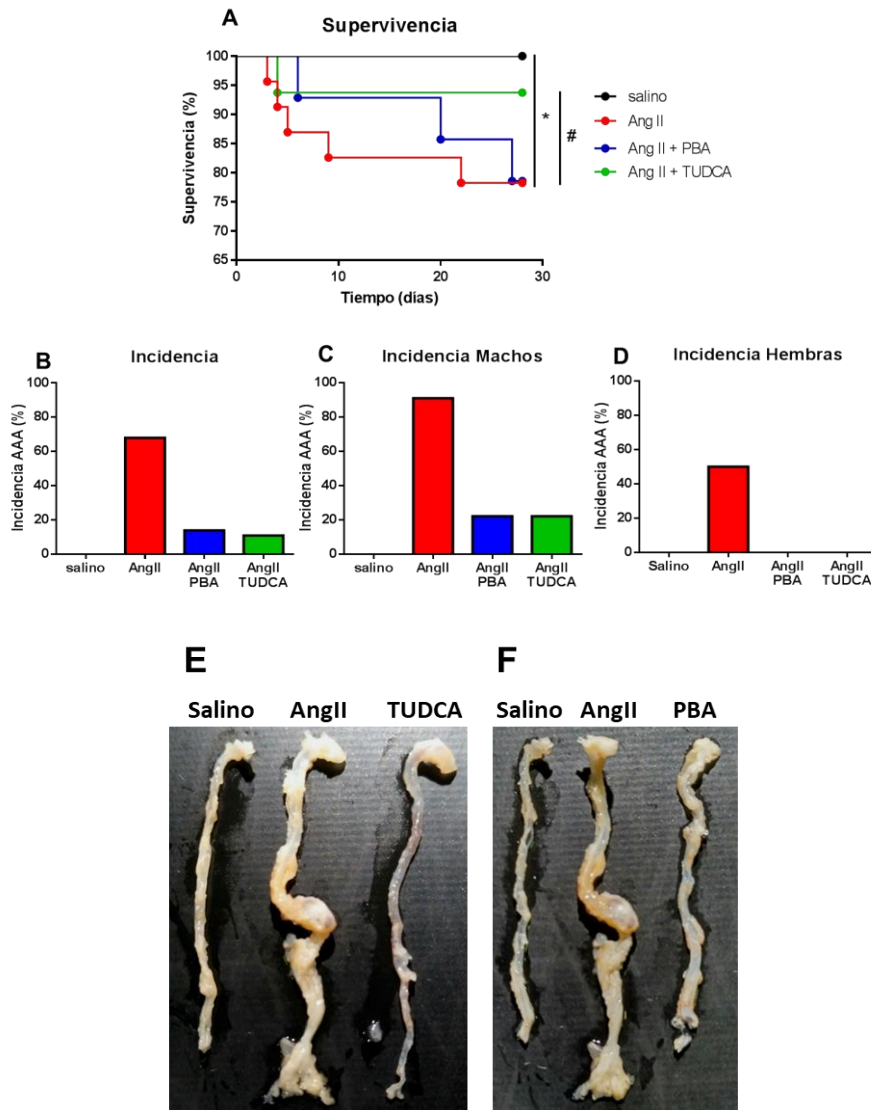


Figura 30. TUDCA incrementa la supervivencia de los ratones infundidos con Ang II y la incidencia de formación de AAA disminuye con la administración de ambos inhibidores del estrés endoplasmático. A) El gráfico muestra los porcentajes de supervivencia (%) de cada grupo experimental B-D) Los histogramas representan el porcentaje de incidencia de AAA total y dividido entre machos y hembras. E-F) Imágenes representativas de aortas fijadas mostrando la formación o no de AAA: E) Salino, Ang II y TUDCA y F) Salino, Ang II y PBA.

2.4 La presión sistólica está reducida significativamente en los ratones tratados con TUDCA y PBA.

Siguiendo los estudios in - vivo estos ratones fueron monitorizados durante 6 semanas para cuantificar la presión sistólica previamente y en paralelo con el seguimiento del diámetro aórtico semanalmente. Se ha descrito anteriormente que los ratones infundidos con Ang II presentan una presión arterial alta y se consideran hipertensos respecto a los animales infundidos con suero salino. El tratamiento con los inhibidores del estrés del retículo redujo de forma leve pero significativa la presión arterial sistólica en los ratones infundidos con Ang II pero no la presión arterial diastólica y media (Tabla 15)

Presiones	Sistólica	Diastólica	Media
Salino (n=7)	101.1 ± 2.4***	70.1 ± 7.6***	81.6 ± 5.2***
Ang II (n=10)	131 ± 6.1 ^{\$\$\$}	97.1 ± 13.3 ^{\$\$\$}	108.8 ± 11.3 ^{\$\$\$}
Ang II + PBA (n=11)	118.5 ± 13* ^{\$\$}	92.2 ± 13.9 ^{\$\$\$}	101.9 ± 15.3 ^{\$\$}
Ang II + TUDCA (n=12)	122.9 ± 10.7* ^{\$\$}	94.4 ± 14.4 ^{\$\$\$}	102.9 ± 12 ^{\$\$\$}

Tabla 15. **Valores de presión arterial en los diferentes grupos de estudio.** *p-valor<0.05 respecto al grupo Ang II; [§]p-valor<0.05 respecto al grupo infundido con solución salina.

2.5 Análisis comparativo de la expresión génica en los diferentes grupos de animales que conforman el estudio.

La expresión de marcadores del estrés del RE fue analizada para estudiar la activación de las tres vías implicadas en la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas (*UPR*) durante la infusión de Ang II en el ratón ApoE^{-/-}. Los niveles de ARNm de todos los marcadores analizados (ERN1, XBP1, ATF6, ATF4, HSPA5 y DDIT3) se hallaron incrementados significativamente en los ratones infundidos con Ang II. La expresión de estos marcadores se estudió en la aorta abdominal de ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II a tiempo 0, y a 3, 7, 14 y 28 días (Fig. 31). Al analizar los marcadores del estrés del RE correspondientes con las diferentes vías de activación del UPR se observó que la expresión génica de la mayoría de ellos aumentaba lo largo del tiempo de infusión con Ang II, excepto HSPA5. La infusión de los ratones con los fármacos PBA y TUDCA redujo de manera diferencial los niveles de expresión génica de los marcadores de estrés del RE ATF6, XBP1, HSPA5, ATF4 y ERN1 (Fig. 32).

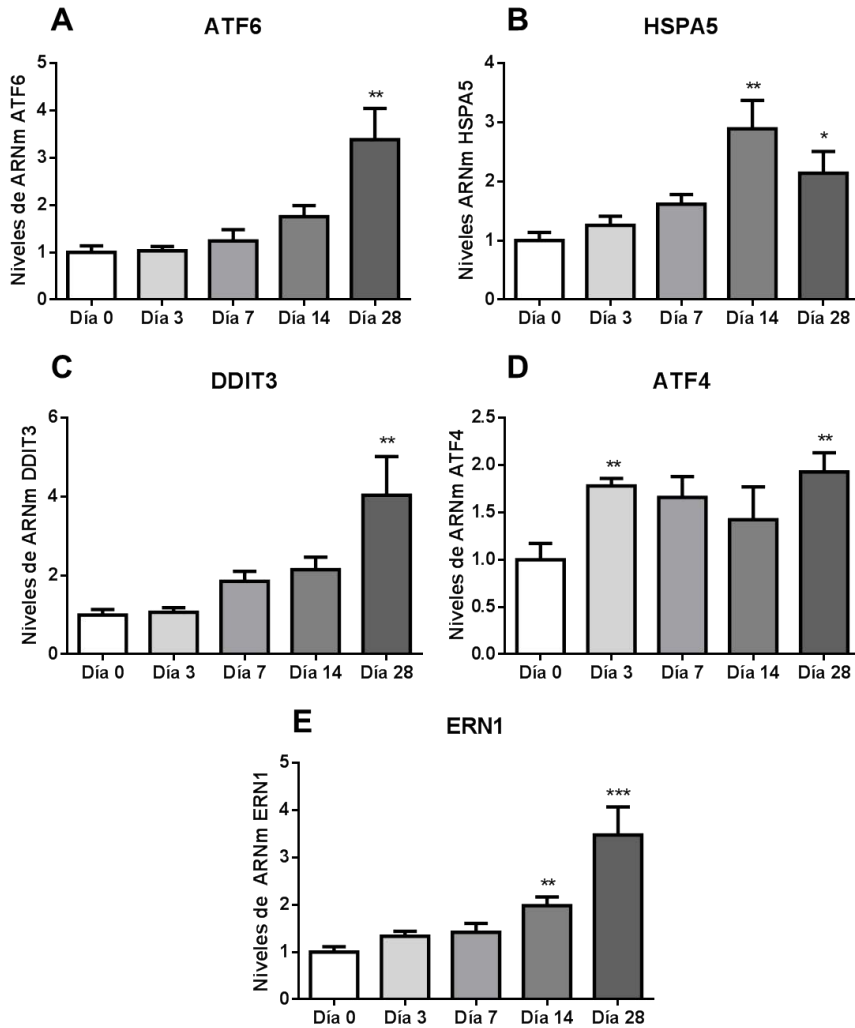


Figura 31. El estudio de expresión génica de los marcadores de estrés del RE realizado a lo largo del tiempo de infusión con Ang II mostró un incremento de los mismos gradual o sostenido. Histogramas mostrando los niveles de ARNm de A) ATF6 B) HSPA5 C) DDIT3 D) ATF4 y E) ERN1 se evaluaron por PCR a tiempo real y se normalizaron mediante la expresión de GAPDH y de β -actina (n=8). Los valores mostrados se corresponden con la media \pm ESM *p<0.05 vs día 0.

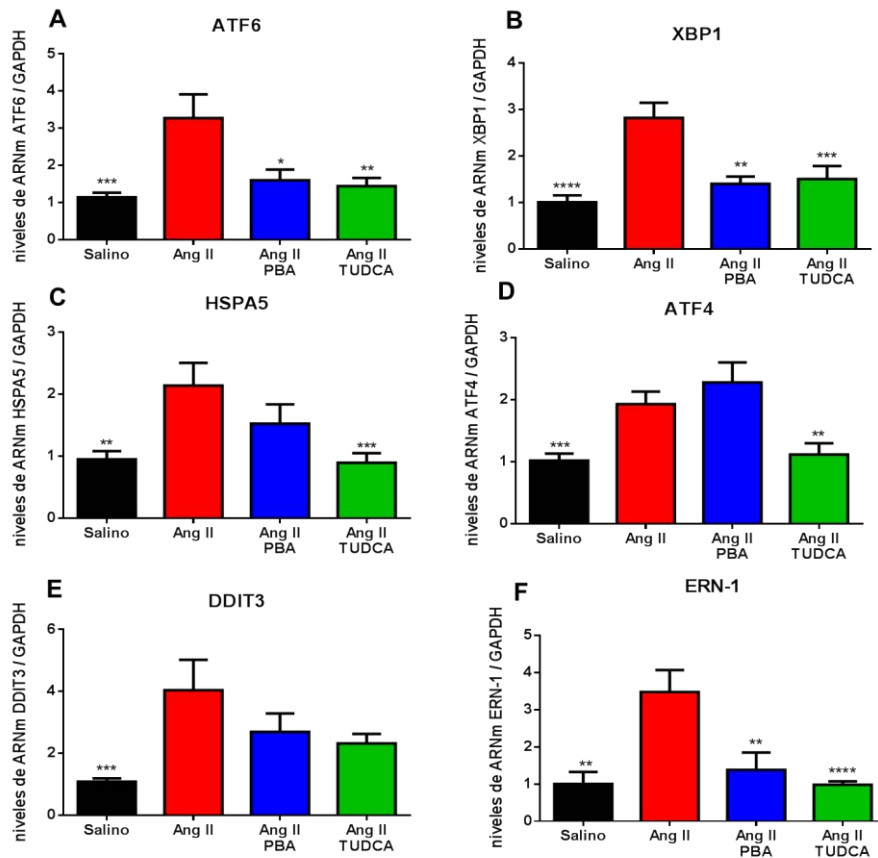


Figura 32. El aumento de la expresión génica de los marcadores del estrés del RE hallado en el AAA del modelo murino ApoE^{-/-} infundido con Ang II se redujo con el tratamiento con PBA y/o TUDCA. A-F) Los niveles de ARNm de ATF6, XBP1, HSPA5, ATF4, DDIT3 y ERN1 se evaluaron por PCR a tiempo real y se normalizaron mediante la expresión de GAPDH (n=8-14). Los valores mostrados se corresponden con la media ± ESM *p<0.05 vs AngII

También estudiamos la expresión de marcadores implicados en la biogénesis mitocondrial y en el proceso de mitofagia: mtCO3, DNML1L y BNIP3 y observamos que su expresión estaba alterada en los ratones infundidos con Ang II. El tratamiento con TUDCA recuperó la expresión génica del mtCO3 a los niveles hallados en el grupo control (ApoE^{-/-} infundidos con salino) (Fig. 33).

Se analizó la expresión de los genes clásicos de la inflamación como son IL-1 β , IL-6, EMR-1 y CCL2. Vimos que su expresión génica estaba aumentada en la aorta abdominal de los animales infundidos con Ang II y que el tratamiento con TUDCA y PBA la disminuía parcial o totalmente a los niveles de expresión encontrados en las aortas de los animales del grupo salino (Fig. 34).

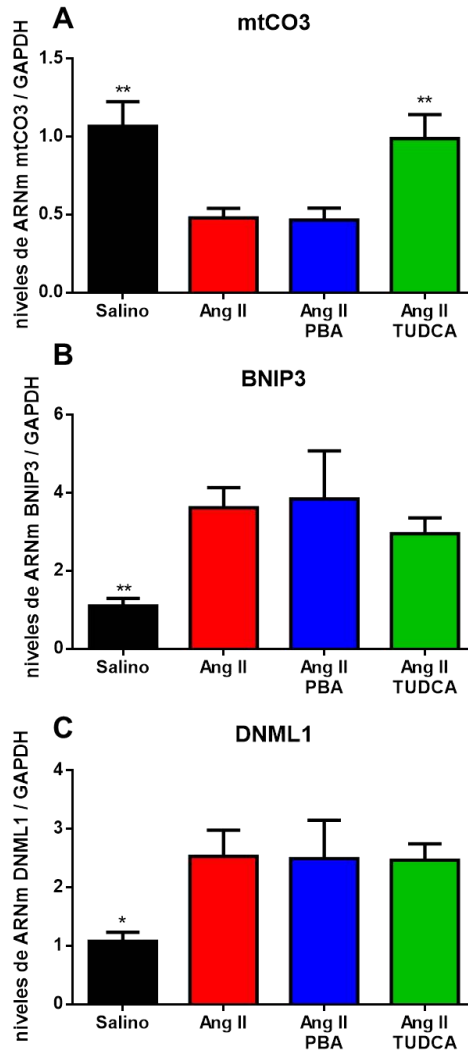


Figura 33. Los marcadores de biogénesis mitocondrial y mitofagia están alterados en el AAA del ratón ApoE^{-/-} infundido con Ang II. A-C) La expresión de mtCO3, BNIP3 y DNML1 se evaluó por PCR a tiempo real y se normalizó con la expresión de GAPDH (n=8-14). Los valores representados se corresponden con la media ± ESM. *p<0.05 vs Ang II.

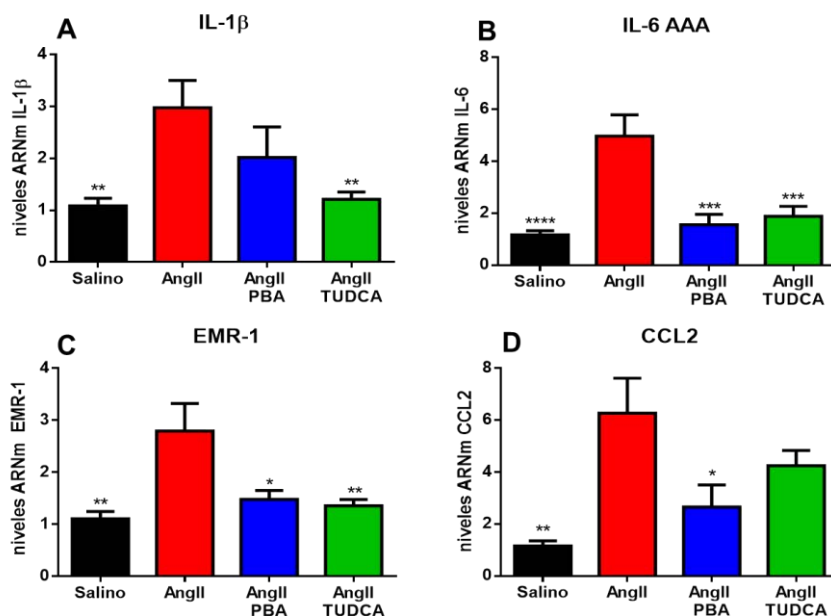


Figura 34. La inducción de la expresión de genes relacionados con la inflamación se halló modulada por el tratamiento con PBA y / o TUDCA. A-D) La expresión de IL-1 β , IL-6, EMR-1 y CCL2 se evaluó por PCR a tiempo real y se normalizó con la expresión de GAPDH (n=8-14). Los valores representados se corresponden con la media \pm ESM. * p <0.05 vs Ang II.

2.6 La actividad enzimática se halló reducida en TUDCA y PBA

Estudiamos los niveles génicos de las metaloproteinasas 2 y 9, que se conocen que están alterados en el AAA, y su actividad enzimática por zimografía clásica para determinar si estaban afectados por la inhibición del estrés del RE in vivo (Fig. 35 A-B). Observamos que la expresión génica de MMP9 y su actividad estaban disminuidas en la aorta abdominal de animales tratados con TUDCA y PBA respecto al grupo Ang II, aunque mostraron mayor actividad que en el grupo salino (Fig. 35 C). Sin embargo, los niveles génicos de la MMP2 sólo se vieron ligeramente reducidos en la aorta de los animales tratados con TUDCA. Respecto a la actividad de la MMP2, observamos que estaba disminuida con TUDCA pero no con PBA (Fig. 35 D).

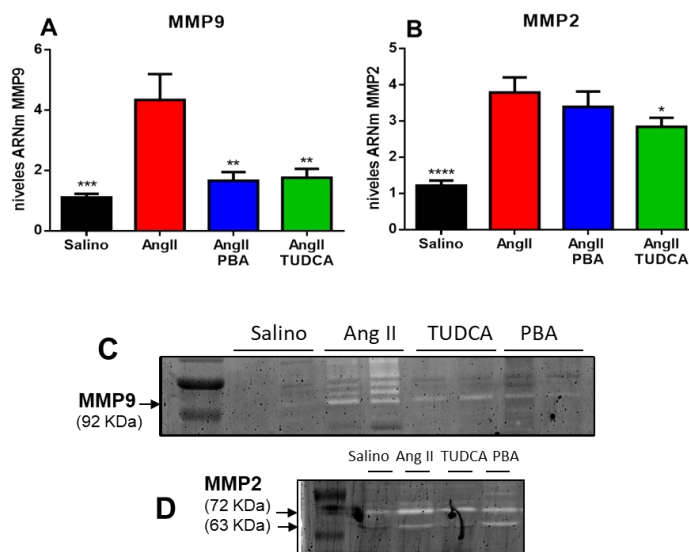


Figura 35. La disminución de la expresión génica de MMP9 por el tratamiento con los inhibidores del estrés del RE se corresponde con una bajada en la actividad enzimática. A-B) La expresión de MMP2 y 9 se evaluó por PCR a tiempo real y se normalizó con la expresión de GAPDH (n=8-14). Los valores representados se corresponden con la media \pm ESM. * p <0.05 vs Ang II. C-D) Gel representativo que muestra los zimógenos de las MMP9 y 2 en extractos proteicos de aorta abdominal de los animales de cada grupo.

2.7 La deficiencia para el gen DDIT3 no limita la dilatación de la aorta abdominal en el modelo ApoE^{-/-} infundido con Ang II.

CHOP es la proteína efectora de apoptosis activada por el estrés del RE. Dada la importancia de los fenómenos de apoptosis que ocurren en la pared vascular durante el desarrollo del AAA quisimos estudiar el efecto de la deficiencia de CHOP en la formación del aneurisma en los ratones doble transgénicos con genotipo ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} infundidos con Ang II. La aorta abdominal de los diferentes grupos de animales (ratones ApoE^{-/-}/CHOP^{-/-} infundidos con solución salina (Salino), ApoE^{-/-}/CHOP^{+/+} o ApoE^{-/-}/CHOP^{+/+} infundidos con Ang II (Ang II) y ratones ApoE^{-/-}/CHOP^{-/-} infundidos con Ang II) fueron monitorizados mediante ultrasonografía a 0 días, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días, coincidiendo este último con el punto final del estudio. Con esta técnica se midió el diámetro aórtico con imágenes capturadas tanto en plano sagital como transversal. A continuación se muestran las figuras de la evolución del diámetro aórtico a diferentes días y a punto final (día 28) (Fig. 36 A-B)

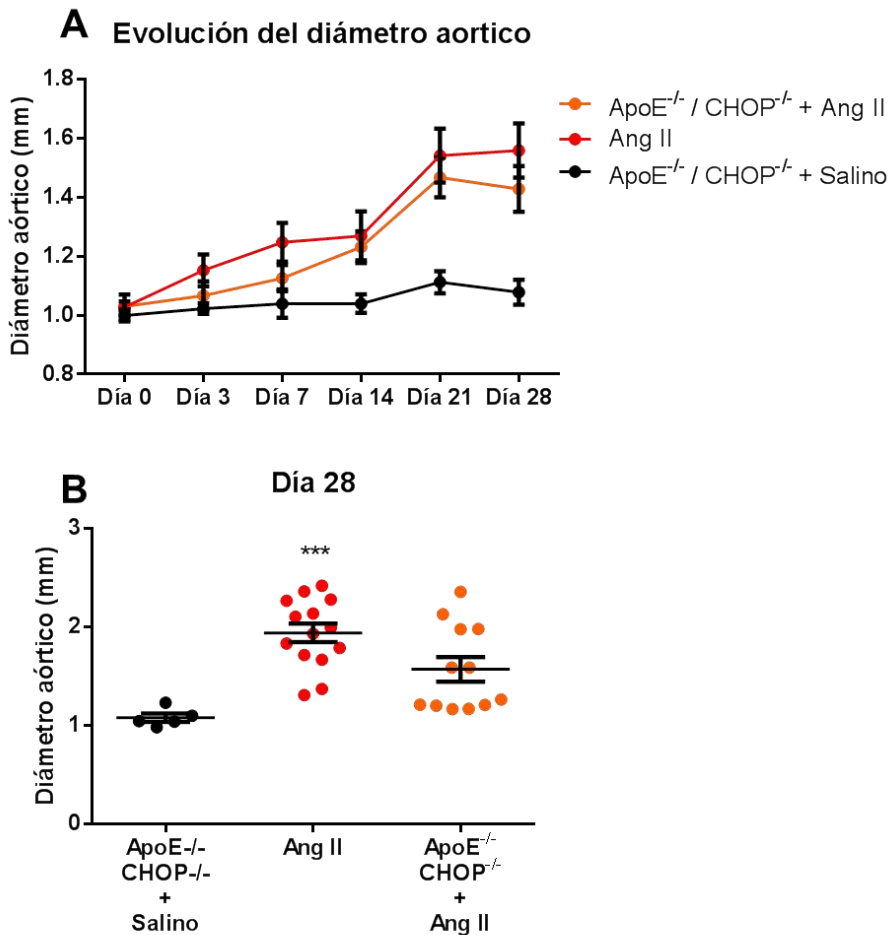


Figura 36. La dilatación del aneurisma de aorta abdominal (AAA) no se halló limitada por la deficiencia del gen que codifica para CHOP. Los ratones ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} fueron infundidos con salino o Ang II durante 28 días. A) Las gráficas muestran la evolución del diámetro aórtico (mm) durante las 4 semanas de tratamiento y B) el diámetro aórtico (mm) a día 28 cuantificados por ultrasonografía (n=5-14). Los datos están expresados como la media ± ESM.

2.8 La deficiencia de DDIT3 reduce la presión arterial y la incidencia de formación de AAA pero no mejora la supervivencia de los animales ApoE^{-/-} infundidos con Ang II.

La supervivencia de los ratones doble transgénicos ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} infundidos con Ang II comparado a los ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II no mostró ninguna diferencia significativa (Fig. 37 A)

En nuestro estudio cuantificamos la incidencia de formación del aneurisma abdominal de aorta comparando los diferentes grupos (ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} + Salino, Ang II y ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} + Ang II). La incidencia disminuyó de forma significativa entre grupos, siendo del 90 % en el Ang II y reduciéndose a un 33% en el grupo ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} + Ang II (Fig. 37 B).

En la figura 25 se muestran fotos representativas de aortas fijadas procedentes de animales incluidos en los diferentes grupos en estudio: ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} + Salino, Ang II y ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} + Ang II en las que es posible apreciar a nivel macroscópico el remodelado aórtico generado en nuestro modelo murino y el efecto beneficioso de la deficiencia genética del gen que codifica para CHOP (Fig. 37 C).

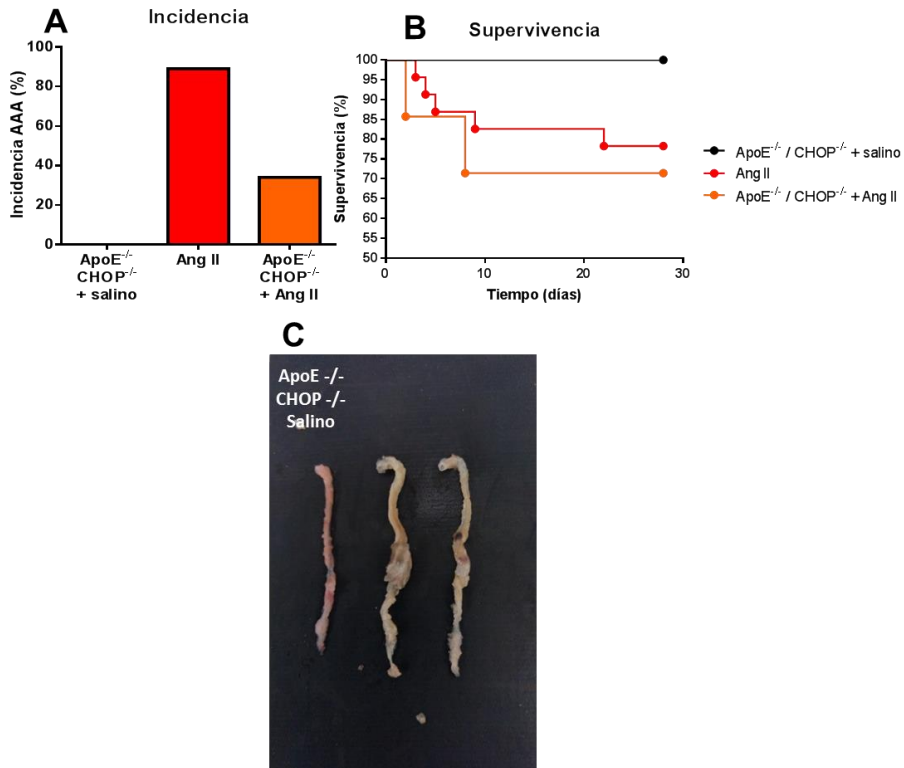


Figura 37. En los ratones ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} la incidencia de AAA disminuye pero la supervivencia es similar a la del grupo de ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II. Comparativa de la supervivencia entre los diferentes grupos de ratones macho y su incidencia. A) El gráfico muestra los ratios de supervivencia (%) de cada grupo. B) Los histogramas representan el porcentaje de incidencia de AAA. C) Imágenes representativas de aortas fijadas mostrando la formación o no de AAA y el remodelado en toda la longitud de la aorta.

2.9 La presión sistólica y media se halló reducida en los ratones ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-}.

Para cuantificar la presión arterial, los ratones ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} fueron monitorizados durante 6 semanas previamente a y durante la infusión con Ang II o salino y en paralelo con el seguimiento del diámetro aórtico semanalmente. La deficiencia del gen DDIT3 mantuvo la presión sistólica en los ratones infundidos con Ang II a valores de presión arterial similares a los observados en los ratones normotensos (Tabla 16).

Valores de presión arterial	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	Media (mm Hg)
ApoE ^{-/-} / CHOP ^{-/-} Salino (n=5)	101 ± 6.3***	75.5 ± 6***	83.7 ± 5.9***
Angiotensina II (n=12)	119 ± 6.3	86.9 ± 15.1	103 ± 11.6
ApoE ^{-/-} / CHOP ^{-/-} + Ang II (n=10)	97.1 ± 9.2*	60.3 ± 15.7	72.2 ± 13.1**

Tabla 16. **La deficiencia en el gen DDIT3 redujo la presión arterial a valores de animales normotensos.** Valores de presión sistólica, diastólica y media en los ratones ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} infundidos con salino o Ang II en comparación con el ratón ApoE^{-/-} / CHOP^{-/+} o ApoE^{-/-} / CHOP^{+/+} infundido con Ang II. *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 y ***p-valor<0.001 respecto a Ang II.

2.10 Análisis bioquímico

El plasma de los ratones fue analizado para analizar su perfil lipídico. Se realizó la cuantificación del colesterol total, de los niveles de colesterol en HDL y los niveles de colesterol no HDL junto con un análisis de la glucosa. (Tabla 17).

	Salino (n=10)	Ang II (n=14)	TUDCA (n=14)	PBA (n=11)
Lípidos plasmáticos totales				
Colesterol (mM)	8.65 ± 0.88	9.02 ± 2.03	9.62 ± 1.99	9.21 ± 1.72
Colesterol libre (%)	25.32 ± 2.67	28.48 ± 5.27	25.59 ± 8.47	29.61 ± 4.17
Fosfolípidos (mM)	2.67 ± 0.41	2.77 ± 0.67	2.95 ± 0.6	2.93 ± 0.59
Lípidos plasmáticos en HDL				
Colesterol (mM)	0.88 ± 0.12	1.11 ± 0.34	1.25 ± 0.37	0.93 ± 0.26
Colesterol libre (mM)	0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.11	0.11 ± 0.13	0.08 ± 0.06
Fosfolípidos (mM)	0.75 ± 0.1	0.92 ± 0.25	0.93 ± 0.2	0.79 ± 0.23
Lípidos plasmáticos en no HDL				
Colesterol (mM)	7.77 ± 1.03	7.91 ± 2.23	8.37 ± 1.39	8.28 ± 0.43
Fosfolípidos (mM)	2.10 ± 0.33	2.03 ± 0.74	2.4 ± 0.73	2.27 ± 0.67
Otros parámetros bioquímicos				
Glucosa (mM)	13.07 ± 2.13	12.3 ± 2.02	11.14 ± 2.61	13.43 ± 2.45

Tabla 17. Perfil lipídico realizado en el plasma de los diferentes grupos de ratones. Se muestran los datos de concentración de colesterol, fosfolípidos, y glucosa.

DISCUSIÓN

En la actualidad, las estrategias terapéuticas en pacientes con aneurisma abdominal de aorta (AAA) se limitan a la reparación quirúrgica invasiva en aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de ruptura. A día de hoy, no se han establecido estrategias farmacológicas efectivas para suprimir el desarrollo de AAA y para prevenir la necesidad de una reparación quirúrgica e invasiva del aneurisma^{107,207-210}. Como consecuencia, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para limitar la progresión de la AAA es uno de los retos a los que se enfrenta la investigación actual.

En la última década, un número creciente de estudios apunta a que una inducción exacerbada del estrés del retículo endoplasmático (RE) y del estrés mitocondrial podría ser perjudicial en múltiples patologías, entre ellas, las enfermedades cardiovasculares en las que se han descrito desregulación del tráfico de proteínas y anomalías del RE compatibles con el estrés del RE^{30,31,211}. Sin embargo, el estrés del RE no se ha considerado como una posible diana terapéutica en el AAA y se desconoce su papel en el proceso degenerativo de la pared vascular durante la formación, expansión y rotura del AAA. Nuestros estudios en tejido aneurismático procedente de pacientes con AAA evidencian la participación del estrés del retículo y del estrés mitocondrial, íntimamente ligados con el estrés oxidativo y con los procesos de apoptosis que ocurren en la pared de la aorta aneurismática.

En las muestras aneurismáticas humanas de nuestra cohorte de pacientes, la respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE (*UPR*) se encontró activada tal y como se demuestra por la sobre-expresión del eje IRE1-XBP1, de ATF6 y CHOP en comparación con las aortas abdominales de donantes, mientras que no se observaron diferencias de expresión génica del factor de

transcripción ATF4 y de HSPA5, que codifica la chaperona BiP, indicando una activación diferencial de los tres ejes de la respuesta de estrés del RE en la etapa final del AAA. Adicionalmente, estudiamos la expresión de dos factores recientemente descritos en el estrés del RE, CRELD2 y SEL1L y observamos que su expresión génica también estaba aumentada en muestras aneurismáticas. CRELD2 está implicado en el procesamiento y tráfico de proteínas a través del aparato RE-Golgi y está regulado por ATF6²¹², mientras que SEL1L participa en el complejo de degradación de proteínas asociado al estrés del retículo (ERAD)²¹³ y señala las proteínas secretoras y de membrana mal plegadas en el RE para su degradación en el proteasoma²¹⁴.

Nuestros estudios de inmunofluorescencia en tejido fijado indicaron que la expresión de marcadores de estrés del RE estaba localizada principalmente en las CMLs de la capa media y, en menor medida, en el infiltrado inflamatorio de la pared aneurismática. Estos resultados sugieren que el estrés del RE podría estar relacionado con la degeneración de la pared arterial que ocurre durante la progresión de la AAA. Recientemente varios autores demostraron que la inhibición del estrés del RE con ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) o a través del tratamiento con el péptido intermedin 1-53 o con estatinas redujo la incidencia de la formación de aneurismas en un modelo murino de la enfermedad evidenciando el papel del estrés del RE en la formación de AAA²¹⁵⁻²¹⁷. Sin embargo, hasta la fecha, el nuestro es el único estudio que ha analizado exhaustivamente las tres ramas efectoras de la respuesta al estrés del RE en una cohorte extensa de pacientes con AAA.

La formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por la actividad de la NADPH oxidasa (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) y por la mitocondria juega un papel crucial en las complicaciones vasculares²¹⁸⁻²²⁰. La expresión y actividad del complejo enzimático NADPH oxidasa se inducen por agentes mecánicos, por agentes vasoactivos (angiotensina II) y por el estrés del RE^{218,219}. El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la inducción de estrés del RE y también se sabe que está involucrado en los mecanismos patológicos subyacentes a la formación del aneurisma de aorta abdominal²²¹. El estrés del RE aumenta la expresión y la actividad de la NADPH oxidasa, la mayor fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO) de origen vascular¹³⁹. A su vez, las especies reactivas de oxígeno O_2^- modulan las reacciones inflamatorias y pueden inducir el reclutamiento de leucocitos, lo que también contribuye a la progresión de AAA²²². En el plasma de nuestra cohorte de pacientes con AAA observamos un aumento de ERO circulantes respecto a los donantes que resultó ser independiente de la edad. En el tejido aneurismático de los pacientes con AAA observamos además una expresión incrementada en las subunidades NOX2 y p22phox de la NADPH oxidasa y una producción exacerbada de aniones superóxido y ERO mitocondriales. En contraposición, la expresión de NOX4 se encontró reducida en la aorta de pacientes con AAA respecto a las muestras de aorta abdominal de donantes, tal y como describieron Guzik y col. en una pequeña cohorte de pacientes con AAA²²³.

El RE está estrechamente relacionado con la función mitocondrial debido a sus comunicaciones estructurales y funcionales dentro de la célula²²⁴. Se cree que la comunicación entre el retículo y la mitocondria en situaciones de estrés da lugar a un círculo vicioso que amplifica el estrés oxidativo que participa de la activación de

mecanismos de autofagia y apoptosis contribuyendo de esta manera al remodelado y al daño tisular¹⁸⁶.

La producción de ERO y activación de apoptosis dependiente de mitocondria juega un papel crítico en la progresión de la AAA en modelos animales²²⁵. Así, se ha demostrado que la inducción de la biogénesis mitocondrial conduce a una disminución de la apoptosis y de la producción de ERO. Por el contrario, la biogénesis mitocondrial se ve disminuida por el estrés oxidativo^{226,227}. En nuestra cohorte de pacientes con AAA observamos que la expresión de los factores de transcripción que activan la biogénesis mitocondrial y regulan la función mitocondrial (PGC1 α , NRF1 y TFAM), así como la expresión de las citocromos B y C oxidasa, se encontraba reducida en el tejido aneurismático sugiriendo una reducción del contenido mitocondrial. En línea con nuestros hallazgos, en un estudio previo se describió una disminución en la expresión de PGC1 α en la capa media de la aorta aneurismática en una cohorte de pacientes suecos²²⁸. Además, la tinción con *Mitotracker green* evidenció una reducción de la masa mitocondrial en la pared aneurismática. Por lo tanto, nuestros resultados refuerzan el concepto de que el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial podría ser una estrategia terapéutica interesante y apuntan a posibles tratamientos que aumenten la biogénesis mitocondrial para reducir la degeneración de la pared vascular en el AAA.

Por otra parte se sabe que los oxisteroles, componentes mayoritarios de las lipoproteínas LDL oxidadas (LDLox), intervienen en la patogénesis del envejecimiento vascular debido a sus propiedades pro-oxidantes, proinflamatorias y pro-apoptóticas. Su contribución a la disfunción endotelial, a la migración de células musculares lisas y a la rigidez arterial debido al incremento de deposición de colágeno y a la

calcificación se ha relacionado con la progresión de procesos patológicos crónicos. Recientemente, se ha observado que el nivel de ciertos oxisteroles y concretamente, los niveles de 7-KC, están alterados en lesiones ateroscleróticas, en ciertas enfermedades neurodegenerativas (con valor pronóstico), en enfermedades intestinales inflamatorias y otras condiciones patológicas caracterizadas por la alteración de captación de colesterol y/o su metabolismo^{138,188,229}. El 7-KC se considera un inductor de procesos de apoptosis en placas ateroscleróticas, un denominador común presente en la pared aórtica de pacientes con AAA que además en su mayoría, presentan dislipemia. Además, se ha descrito como un potente inductor del estrés del RE y de procesos de autofagia en cultivos de células vasculares^{138,145}.

En nuestra cohorte de pacientes aneurismáticos, encontramos un perfil de oxisteroles claramente alterado curiosamente similar al perfil de oxisteroles recientemente descrito en un estudio realizado en pacientes con esclerosis múltiple (EM)¹⁶². Otros estudios han demostrado que los niveles de oxisteroles están alterados en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, enfermedades en las que el estrés del RE desempeña un papel crítico^{160,162,230}. Los niveles de 7-KC se encontraron significativamente más elevados en el plasma de los pacientes con AAA en comparación con los donantes sanos y que mostraban una correlación positiva con la expresión vascular de los marcadores de estrés del RE en AAA. En este contexto, en publicaciones recientes se ha resaltado la importancia de los oxisteroles circulantes en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y, en particular, el aumento de los niveles de 7-KC se ha asociado con eventos de enfermedades cardiovasculares^{159,231}. Sin embargo, la repercusión fisiopatológica del aumento de 7-KC circulante en pacientes con AAA aún está por

dilucidar y se necesitan realizar estudios adicionales en otras cohortes de pacientes que apoyen nuestros hallazgos.

En los ensayos con CMLs humanas, la incubación con 7-KC evocó la inducción de estrés del RE y fenómenos de apoptosis, tal y como reportaron anteriormente Pedruzzi E y col.²³². Se ha descrito que 7-KC amplifica los procesos inflamatorios y regula la expresión de citoquinas inflamatorias y metaloproteinasas (MMPs)¹⁸⁸. En consecuencia, encontramos una inducción de la expresión de MMP-2 e IL-1 β en CMLs humanas auspiciada por 7-KC, lo que respalda el efecto perjudicial que este oxisterol podría tener en la pared vascular durante el desarrollo de la enfermedad aneurismática.

En cuanto a otros oxisteroles, en nuestra cohorte de pacientes los niveles de 7 β -HC fueron similares a los de los donantes. En contraste, los niveles circulantes de 7 α -HC, 24-S-HC y 27-HC se hallaron significativamente más bajos en los pacientes con AAA. Comparados con otros oxisteroles, los niveles de 24-HC son dependientes de la edad y disminuyen notablemente a partir de los sesenta años. Una disminución en los niveles de 24-HC ha sido reportada anteriormente en pacientes con EM y con Alzheimer²³³. Sin embargo, no se encontró correlación entre los niveles de los distintos oxisteroles y la edad de los individuos, lo cual se podría atribuir a la edad avanzada de nuestra cohorte de pacientes y donantes de AAA. 24-HC y 27-HC son ligandos de los receptores X del hígado (LXR) que controlan la transcripción de los genes implicados en la homeostasis del colesterol y la inmunidad innata²³⁴. Nuestra hipótesis es que una disminución en los niveles de 24-HC, 27-HC y 7 α -HC podría alterar la homeostasis del colesterol y exacerbar una respuesta inmunológica en la pared vascular a través de una reducción en la activación de los LXR. En conjunto, estos

hallazgos sugieren que una alteración en la red de oxisteroles puede contribuir a la progresión del AAA.

Especulamos que el aumento de 7-KC circulante podría ocasionar un incremento del colesterol libre intracelular y del estrés oxidativo. Entre los oxisteroles, 7-KC y 27-HC, ambos inducen ERO en CML y en células no vasculares^{235,236}. En nuestros estudios con cultivos primarios humanos observamos que la pre-incubación de CMLs con antioxidantes atenuaba el aumento de la expresión de marcadores de estrés oxidativo y del RE inducidos por 7-KC. En este contexto encontramos una correlación positiva entre la expresión de NOX2 o p22phox y los niveles de 7-KC en pacientes con AAA, lo que respalda el impacto negativo que este oxisterol pueda tener en la homeostasis vascular.

La activación del estrés del RE puede desencadenar cambios no sólo en la función mitocondrial sino también en la autofagia²³⁷ y se ha descrito que el 7-KC induce autofagia y apoptosis en placas ateroscleróticas avanzadas²³⁸. La autofagia es un proceso catabólico importante que suministra proteínas, componentes citoplasmáticos y orgánulos a los lisosomas para su degradación y reciclaje. Si bien la autofagia es un mecanismo citoprotector crítico, se ha sugerido que interviene en la muerte celular programada dependiendo de las circunstancias celulares^{146,239}. En este estudio, encontramos un aumento en la expresión de Beclin-1, LC3II y p62 en aortas aneurismáticas humanas. A su vez, la mitofagia elimina la acumulación de mitocondrias dañadas que, de otra manera, resultan en una producción excesiva de ERO y apoptosis^{237,240}. Los niveles de la proteína DRP1, un marcador de mitofagia, se encontraron disminuidos en el tejido aneurismático respecto al tejido sano de los donantes. Esta reducción podría derivarse de la disminución del

contenido mitocondrial, pero también podría sugerir que este mecanismo de protección esté desregulado en la pared aneurismática.

En paralelo al estudio realizado en muestras humanas procedentes de nuestra cohorte de pacientes con AAA, realizamos un estudio preclínico en el ratón ApoE^{-/-} infundido con Ang II como modelo experimental de AAA para testar el efecto *in vivo* de dos compuestos inhibidores del estrés del RE. Escogimos este modelo dada su alta reproducibilidad e incidencia en la formación de aneurismas abdominales¹³³⁻¹³⁵.

Los compuestos usados fueron el Fenilbutirato de sodio (PBA) y el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), cuya actividad inhibitoria sobre el estrés del RE se ha demostrado ampliamente^{191,192}. El PBA es un fármaco ampliamente utilizado y descubierto hace más de 50 años usado como adyuvante para el tratamiento crónico de enfermedades congénitas de deficiencias en la producción de enzimas del ciclo de la urea²⁴¹. Por otro lado el TUDCA, es un ácido biliar de la familia de los ácidos cólicos que comenzó a estudiarse en la década de los 80 para el tratamiento de cálculos biliares^{242,243}.

El estudio *in-vivo* demostró que el diámetro aórtico en los ratones infundidos con Ang II y tratados con PBA o TUDCA se veía disminuido significativamente respecto al grupo problema (Ang II).-La incidencia de AAA en los ratones ApoE^{-/-} infundidos con Ang II de ambos sexos se halló disminuida con la administración de PBA y TUDCA. Al separar por sexos, la incidencia de formación de AAA en hembras (50 % en el grupo problema) se vio reducida al 0 % y en machos al 20 %.

En la bibliografía actual no hay estudios en animales de experimentación sobre el desarrollo de AAA que solo incluyan

hembras y los estudios que incluyen animales de ambos sexos son escasos^{132,244-246}. En estudios previos sobre mujeres y AAA es evidente que se ha infravalorado los diámetros aórticos en mujeres en el desarrollo del aneurisma debido a su baja prevalencia¹⁷ respecto a la población masculina y seguir descartando a las hembras para los estudios in-vivo puede ser un grave error al no tener en cuenta las diferencias fisiológicas entre machos y hembras. En cuanto a las diferencias fisiológicas, la disminución del AAA en hembras parece provenir del papel protector de las hormonas, pues el efecto desaparece al alcanzar la menopausia^{8,245,246}.

La supervivencia de los diferentes grupos fue monitorizada en este estudio y observamos que el tratamiento con TUDCA la mejoró sustancialmente mientras que, el tratamiento con PBA a día 28 mostró la misma mortalidad que el grupo problema aunque se observó un retraso en los eventos de muerte. Estos efectos se podrían explicar por la bajada en la dilatación aórtica y en la incidencia de AAA en el caso del tratamiento con TUDCA, pero en el caso de PBA y a pesar de disminuir el diámetro aórtico y la incidencia, la mortalidad se mantuvo indicando que el TUDCA tiene un efecto protector adicional a nivel de pared mientras que el tratamiento con PBA reduce el desarrollo del aneurisma pero no evita la ruptura de la pared aórtica. Estos datos evidencian claramente la relación existente entre el estrés del RE y el desarrollo del AAA, y demuestra la eficacia de estos fármacos para paliar el desarrollo de la enfermedad.

En cuanto a la presión arterial, los valores de la presión sistólica, diastólica y media demuestran que todos los animales infundidos con Ang II son hipertensos, pero en el caso de la presión sistólica los grupos de animales tratados con PBA y TUDCA mostraron una disminución significativa respecto al grupo Ang II. Con estos datos

podemos especular que los fármacos TUDCA y PBA tienen un ligero efecto beneficioso sobre la presión arterial, pero insuficiente para normalizar la presión sistólica del ratón.

Los hallazgos obtenidos de nuestros estudios *in vivo* están respaldados en la literatura por otros estudios realizados sobre AAA en ratones y que han sido publicados durante el desarrollo de la parte experimental que se incluye en este trabajo de tesis^{215,217}.

Para complementar los resultados obtenidos de la inhibición farmacológica del estrés del RE realizamos estudios adicionales en animales para estudiar si la deficiencia en el factor pro-apoptótico CHOP que se ve activado por una inducción crónica del estrés del RE limitaba la formación de AAA en el ratón ApoE^{-/-} infundido con Ang II.

La incidencia de formación de AAA se vio reducida en los animales macho ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} respecto a los animales macho ApoE^{-/-} infundidos con Ang II. Además, en la gráfica donde se muestra la evolución del diámetro aórtico a lo largo del tiempo de estudio observamos una tendencia a la estabilización de la expansión del mismo respecto al grupo problema (ratones macho ApoE^{-/-} / CHOP^{+/+} y ApoE^{-/-} / CHOP^{+/-} infundidos con Ang II).

En cuanto a la supervivencia, los animales ApoE^{-/-} / CHOP^{-/-} infundidos con Ang II parecen seguir la misma tendencia que los animales del grupo problema. Estos resultados indican que la deficiencia genética de CHOP no protege de la formación de AAA ni reduce los eventos de muerte por ruptura asociados si bien disminuye la incidencia.

En definitiva, nuestros datos *in vivo* indican que TUDCA es un fármaco protector para el desarrollo y ruptura del AAA mientras que PBA tiene un rol protector en la formación del AAA pero un efecto insuficiente en cuanto a que no protege de la ruptura de la aorta y que la supresión

de apoptosis dependiente del estrés del retículo puede contribuir al desarrollo del AAA pero es insuficiente para prevenir su formación y el riesgo de ruptura.

En la aorta abdominal de los animales de los diferentes grupos de estudio se analizaron marcadores del estrés del RE tales como ATF6, XBP-1, HSPA5, ATF4, CHOP o ERN1. Comparado con los niveles expresados en el grupo Ang II, el tratamiento con TUDCA disminuyó significativamente la expresión de todos los marcadores a excepción de CHOP. Por otro lado el tratamiento con PBA tuvo unos efectos más limitados pues únicamente disminuyó significativamente la expresión de ATF6, XBP-1 y ERN1, mientras que la expresión HSPA5, ATF4 y CHOP no se vio modulada. Estos resultados explican que TUDCA sea más efectivo para limitar el desarrollo de AAA que el tratamiento con PBA.

Al analizar la expresión de genes relacionados con la mitofagia y la biogénesis mitocondrial, observamos que la expresión del gen mtCO3 como indicador de la masa mitocondrial se encontró disminuido²⁴⁷ mientras que la expresión del gen DNM1L que codifica a la proteína *dynamin related protein 1* y la del gen BNIP3 que codifica a la proteína 3 que interactúa con BCL2^{248,249} se encontraron aumentados en la aorta abdominal del grupo problema. DRP-1 es clave en la fisión mitocondrial en células normales y media la fragmentación mitocondrial durante el proceso de muerte celular programada^{182,250} BNIP3 es una proteína pro-apoptótica que participa de la apoptosis mediada por mitocondria a través de la formación de poros en la membrana externa mitocondrial e interviene en el recambio mitocondrial por autofagia. Su sobreexpresión se relaciona además con la generación de ERO. El equilibrio entre la destrucción y la generación de mitocondrias es importante por cuanto afecta a la

generación de ERO y activa o inhibe la apoptosis. Una mitocondria disfuncional junto con una disminución de la biogénesis mitocondrial puede conllevar un rápido incremento en el daño oxidativo, lo que conllevaría la muerte celular^{186,187}.

El tratamiento con TUDCA previno la bajada de expresión de mtCO3 pero ninguno de los dos inhibidores del estrés del RE tuvo efecto en la expresión de DNML1 y BNIP3 en la aorta abdominal de los animales infundidos con Ang II. Estos resultados indican que el tratamiento con TUDCA puede tener cierto efecto protector de la biogénesis mitocondrial y que la inhibición del estrés del RE por cualquiera de las dos chaperonas químicas no previene la apoptosis dependiente de mitocondria en la aorta abdominal.

También se analizaron genes relacionados con la inflamación ya que la inflamación se halla íntimamente relacionada con el AAA. La expresión génica de IL-1 β , IL-6, CCL2 y EMR-1 se halló aumentada en la aorta abdominal de los animales infundidos con Ang II. IL-1 β e IL6 son dos citoquinas pro-inflamatorias liberadas por macrófagos y monocitos pero también por la CMLs favoreciendo el reclutamiento leucocitario. La IL-6 se induce por la IL-1 β y al contrario que ésta, la IL-6 puede tener también un papel anti-inflamatorio. La CCL2 también conocida como MCP-1 es una proteína relacionada con el reclutamiento leucocitario, específicamente de los monocitos y finalmente, el EMR-1 es un receptor de membrana de macrófagos que no se expresa por células vasculares^{251,252}. También se analizó la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9, ampliamente relacionadas con la remodelación de la MEX y se vio que estaba claramente inducida en la aorta abdominal de los animales infundidos con Ang II. La expresión de EMR-1 e IL-6 se encontró disminuida con ambos tratamientos mientras que la expresión de IL-1 β se vio modulada

únicamente por el tratamiento con TUDCA y la de CCL2 por el tratamiento con PBA. Estos datos demuestran que el tratamiento con ambos inhibidores reduce la inflamación a nivel de pared que caracteriza al AAA. En cuanto a la expresión y actividad zimogénica de las metaloproteinasas, sólo la de MMP9 se halló disminuida con ambos tratamientos en la aorta abdominal de los animales infundidos con Ang II mientras que la expresión de MMP2 pero no su actividad gelatinolítica se halló disminuida por la administración de TUDCA. Esto explicaría en parte que el TUDCA proteja más de la ruptura del aneurisma respecto al tratamiento con PBA.

En resumen, nuestro estudio resalta la importancia del estrés del RE y la biogénesis mitocondrial en AAA y demuestra, por primera vez, que una alteración del perfil de oxisteroles puede estar asociada a esta enfermedad. Nuestros datos respaldan la hipótesis de que el aumento en los niveles de 7-KC y la disminución en las concentraciones plasmáticas de varios hidroxicolesteroles podrían contribuir a la activación del estrés del RE y la inflamación crónica en la aorta de los pacientes con AAA.

Además, los resultados obtenidos de nuestros estudios en animales demuestran que la inhibición del estrés en el RE limita la formación del AAA y respaldan la contribución del estrés del RE en el desarrollo de esta enfermedad como parte de los procesos fisiopatológicos implicados. En definitiva, nuestros resultados sugieren que el estrés del RE y la disfunción mitocondrial podrían ser dianas potenciales de nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a limitar la progresión del aneurisma en pacientes que se diagnostican con AAA en una etapa temprana y en los que se hace seguimiento del diámetro aórtico.

Limitaciones de nuestro estudio

En nuestro estudio, encontramos las restricciones inherentes del trabajo con especímenes humanos. En concreto, la disponibilidad de muestras aórticas se ve obstaculizada por el requisito de donantes multiorgánicos, de los cuales es casi imposible obtener muestras de sangre. Por lo tanto, la aorta saludable y los donantes de sangre no son del mismo grupo de individuos. Finalmente, hay diferencias importantes entre los pacientes con AAA y los donantes sanos con respecto a los datos clínicos. Falta la información clínica completa de los donantes de nuestro estudio, incluyendo aquellos tratamientos farmacológicos a los que estuvieran sometidos y que pudieran interferir en nuestros resultados. Sin embargo, después de realizar el análisis estadístico correspondiente, podríamos excluir la edad, el sexo, el tabaquismo, la hipertensión y la diabetes tipo 2 como factores de confusión de nuestras observaciones actuales.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo respecto a las hipótesis marcadas son las siguientes:

Respecto a la primera hipótesis:

1. La expresión de los marcadores del estrés del RE, el estrés oxidativo y la apoptosis están aumentados mientras que la biogénesis mitocondrial se encuentra disminuida en las muestras de AAA de pacientes en comparación con muestras de aorta abdominal procedente de donantes. Estos resultados nos indican que el estrés del RE crónico forma parte de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la formación del AAA.

Respecto la segunda hipótesis:

2. Los niveles de algunos oxisteroles y otras moléculas circulantes de marcadores potenciales de la enfermedad están alterados en el plasma de pacientes con AAA pero en su mayoría no se asocian con el diámetro de la aorta aneurismática; únicamente existe correlación positiva entre los niveles de Gdf15 y el diámetro.

Respecto la tercera hipótesis:

3. Tanto la inhibición farmacológica para reducir el estrés del RE *in vivo* como la deficiencia génica del factor pro-apoptótico CHOP activado por el estrés del RE en animales de experimentación, reducen la incidencia de formación del AAA y protegen la pared vascular del remodelado destructivo que ocurre en el desarrollo del AAA.

En definitiva, podemos concluir que nuestros resultados evidencian la activación de estrés del RE en el AAA humano y sugieren que su inhibición podría constituir una estrategia terapéutica para limitar del desarrollo de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brady, A. R., Thompson, S. G., Fowkes, F. G. R., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T. Abdominal aortic aneurysm expansion: Risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation* (2004). doi:10.1161/01.CIR.0000133279.07468.9F
2. Moll, F. L. *et al.* Management of Abdominal Aortic Aneurysms Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **41**, S1–S58 (2011).
3. D'Antoni, A. V. Gray's Anatomy, the Anatomical Basis of Clinical Practice, Forty-First Edition, by Susan Standring, Editor-in-Chief, Elsevier Limited , 2016, 1,562 Pages, Hardcover, \$228.99 (\$171.74), ISBN: 978-0-7020-5230-9. *Clin. Anat.* **29**, 264–265 (2016).
4. Journal 'Morphologia', E. office of. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fourteenth Edition 14th Edition / Anthony Mescher. - McGraw-Hill Education / Medical: 2016. – 1136 p. *Morphologia* **10**, 102 (2016).
5. McDonald, D. A. Hemodynamics. *Annu. Rev. Physiol.* **30**, 525–56 (1968).
6. Wolinsky, H. & Glagov, S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ. Res.* **20**, 409–21 (1967).
7. Dobrin, P. B., Baker, W. H. & Gley, W. C. Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. Implications for the mechanical properties of aneurysms. *Arch. Surg.* **119**, 405–9 (1984).
8. Makrygiannis, G. *et al.* Sex differences in abdominal aortic aneurysm: The role of sex hormones. *Annals of Vascular Surgery* (2014). doi:10.1016/j.avsg.2014.07.008
9. Gillum, R. F. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *J. Clin. Epidemiol.* **48**, 1289–1298 (1995).
10. Lilja, F., Mani, K. & Wanhainen, A. Editor's Choice – Trend-break in Abdominal Aortic Aneurysm Repair With Decreasing Surgical Workload. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **53**, 811–819 (2017).
11. Svensjö, S. *et al.* Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation* **124**, 1118–1123 (2011).
12. Persson, S. E., Boman, K., Wanhainen, A., Carlberg, B. & Arnerlöv, C. Decreasing prevalence of abdominal aortic aneurysm and changes in cardiovascular risk factors. *J. Vasc. Surg.* **65**, 651–658 (2017).
13. Scott, R. A. P. *et al.* The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: A randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 1531–1539 (2002).
14. Norman, P. E. *et al.* Population based randomised controlled trial on impact of

- screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *Br. Med. J.* **329**, 1259–1262 (2004).
15. Lindholt, J. S., Juul, S., Fasting, H. & Henneberg, E. W. Screening for abdominal aortic aneurysms: Single centre randomised controlled trial. *Br. Med. J.* **330**, 750–752 (2005).
 16. Ashton, H. A. *et al.* Fifteen-year follow-up of a randomized clinical trial of ultrasonographic screening for abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* **94**, 696–701 (2007).
 17. Rogers, I. S. *et al.* Distribution, determinants, and normal reference values of thoracic and abdominal aortic diameters by computed tomography (from the framingham heart study). *Am. J. Cardiol.* **111**, 1510–1516 (2013).
 18. Sakalihan, N. *et al.* Abdominal aortic aneurysms. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 34 (2018).
 19. Lederle, F. A. *et al.* The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch. Intern. Med.* **160**, 1425–30 (2000).
 20. Lederle, F. A., Nelson, D. B. & Joseph, A. M. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: A systematic review. *J. Vasc. Surg.* **38**, 329–334 (2003).
 21. Kent, K. C. *et al.* Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J. Vasc. Surg.* **52**, 539–548 (2010).
 22. Lindholt, J. S., Jørgensen, B., Klitgaard, N. A. & Henneberg, E. W. Systemic Levels of Cotinine and Elastase, but not Pulmonary Function, are Associated with the Progression of Small Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **26**, 418–422 (2003).
 23. Salem, M. K. *et al.* Should Asian Men be Included in Abdominal Aortic Aneurysm Screening Programmes? *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **38**, 748–749 (2009).
 24. Clifton, N. A. *Familial abdominal aortic aneurysms. The British Journal of Surgery* **64**, (1977).
 25. Verloes, A., Sakalihan, N., Koulischer, L. & Limet, R. Aneurysms of the abdominal aorta: familial and genetic aspects in three hundred thirteen pedigrees. *J. Vasc. Surg.* **21**, 646–655 (1995).
 26. Salo, J. A., Soisalon-Soininen, S., Bondestam, S. & Mattila, P. S. Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm. *Ann. Intern. Med.* **130**, 637–42 (1999).
 27. Wilink, A., Quick, C., Hubbard, C. S. & Day, N. The Association Between

- Connective Tissue Laxity and the Risk of an Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **20**, 290–295 (2000).
28. Wahlgren, C. M., Larsson, E., Magnusson, P. K. E., Hultgren, R. & Swedenborg, J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J. Vasc. Surg.* **51**, 3–7 (2010).
29. Bertoli-Avella, A. M. *et al.* *Mutations in a TGF- β Ligand, TGFB3, Cause Syndromic Aortic Aneurysms and Dissections.* (2015).
30. Minamino, T., Komuro, I. & Kitakaze, M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circulation Research* **107**, 1071–1082 (2010).
31. Binder, P. *et al.* Pak2 as a Novel Therapeutic Target for Cardioprotective Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Circ. Res.* **124**, 696–711 (2019).
32. Larsson, E. *et al.* High frequency of thoracic aneurysms in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann. Surg.* **253**, 180–184 (2011).
33. Chaer, R. A. *et al.* Synchronous and metachronous thoracic aneurysms in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **56**, 1261–1265 (2012).
34. Hernesniemi, J. A., Vänni, V. & Hakala, T. The prevalence of abdominal aortic aneurysm is consistently high among patients with coronary artery disease. *Journal of Vascular Surgery* **62**, 232-240.e3 (2015).
35. Johnsen, S. H., Forsdahl, S. H., Singh, K. & Jacobsen, B. K. Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: A causal event or a process running in parallel? the tromsø study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1263–1268 (2010).
36. Cronin, O. *et al.* Visceral adiposity is not associated with abdominal aortic aneurysm presence and growth. *Vasc. Med. (United Kingdom)* **19**, 272–280 (2014).
37. Golledge, J., Clancy, P., Jamrozik, K. & Norman, P. E. Obesity, Adipokines, and Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation* **116**, 2275–2279 (2007).
38. Long, A. *et al.* Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysm and Large Infrarenal Aorta in Patients With Acute Coronary Syndrome and Proven Coronary Stenosis: A Prospective Monocenter Study. *Ann. Vasc. Surg.* **24**, 602–608 (2010).
39. Stackelberg, O., Björck, M., Larsson, S. C., Orsini, N. & Wolk, A. Fruit and vegetable consumption with risk of abdominal aortic aneurysm. *Circulation* **128**, 795–802 (2013).
40. Wong, D. R., Willett, W. C. & Rimm, E. B. Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men. *Am. J. Epidemiol.* **165**, 838–845 (2007).

41. Iribarren, C. *et al.* Traditional and Novel Risk Factors for Clinically Diagnosed Abdominal Aortic Aneurysm: The Kaiser Multiphasic Health Checkup Cohort Study. *Ann. Epidemiol.* **17**, 669–678 (2007).
42. Behr-Rasmussen, C., Grøndal, N., Bramsen, M. B., Thomsen, M. D. & Lindholt, J. S. Mural thrombus and the progression of abdominal aortic aneurysms: A large population-based prospective cohort study. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **48**, 301–307 (2014).
43. Shantikumar, S., Ajjan, R., Porter, K. E. & Scott, D. J. A. Diabetes and the Abdominal Aortic Aneurysm. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* **39**, 200–207 (2010).
44. Lederle, F. A. *et al.* Multicentre study of abdominal aortic aneurysm measurement and enlargement. *Br. J. Surg.* **102**, 1480–1487 (2015).
45. Xu, J., Murphy, S. L., Kochanek, K. D., Bastian, B. A. & Statistics, V. National Vital Statistics Reports Deaths : Final Data for 2013. **64**, (2016).
46. Bhak, R. H. *et al.* Factors associated with small abdominal aortic aneurysm expansion rate. *JAMA Surg.* **150**, 44–50 (2015).
47. Lederle, F. A. *et al.* Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann. Intern. Med.* **126**, 441–9 (1997).
48. Modai, D. H., Limet, R. H. & Sakalihassan, N. H. Determination of the expansion rate and incidence of rupture of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **14**, 540–548 (2002).
49. Mani, K., Wanhainen, A., Lundkvist, J. & Lindström, D. Cost-effectiveness of intensive smoking cessation therapy among patients with small abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **54**, 628–636 (2011).
50. Sweeting, M. J., Thompson, S. G., Brown, L. C. & Powell, J. T. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br. J. Surg.* **99**, 655–665 (2012).
51. Takagi, H. & Umemoto, T. Association of Hypertension with Abdominal Aortic Aneurysm Expansion. *Ann. Vasc. Surg.* **39**, 74–89 (2017).
52. Small, T. U. K., Trial, A., Brown, L. C. & Powell, J. T. *Risk Factors for Aneurysm Rupture in Patients Kept Under Ultrasound Surveillance.* (1999).
53. Schmitz-Rixen, T. *et al.* Ruptured abdominal aortic aneurysm—epidemiology, predisposing factors, and biology. *Langenbeck's Arch. Surg.* **401**, 275–288 (2016).
54. C Darling, R., R Messina, C., C Brewster, D. & W Ottinger, L. *Autopsy study of unoperated abdominal aortic aneurysms. The case for early resection.*

- Circulation* **56**, (1977).
55. Raaz, U. *et al.* Segmental aortic stiffening contributes to experimental abdominal aortic aneurysm development. *Circulation* **131**, 1783–1795 (2015).
 56. Chang, T. W.-Z., Gracon, A. S. A., Murphy, M. P. & Wilkes, D. S. Exploring autoimmunity in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **22908**, ajpheart.00273.2015 (2015).
 57. Fillinger, M. F., Raghavan, M. L., Marra, S. P., Cronenwett, J. L. & Kennedy, F. E. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *J. Vasc. Surg.* **36**, 589–597 (2002).
 58. Kleinstreuer, C. & Li, Z. Analysis and computer program for rupture-risk prediction of abdominal aortic aneurysms. *Biomed. Eng. Online* **5**, 19 (2006).
 59. Gasser, T. C. *et al.* A novel strategy to translate the biomechanical rupture risk of abdominal aortic aneurysms to their equivalent diameter risk: Method and retrospective validation. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **47**, 288–295 (2014).
 60. Soto, B. *et al.* Increased Peak Wall Stress, but Not Maximum Diameter, Is Associated with Symptomatic Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **54**, 706–711 (2017).
 61. Vantrimpont, P. J. M. J., Van Dalen, B. M., Van Riemsdijk-Van Overbeeke, I. C., Maat, A. P. W. M. & Balk, A. H. M. M. Abdominal Aortic Aneurysms after Heart Transplantation. *J. Hear. Lung Transplant.* **23**, 171–177 (2004).
 62. Cron, D. C., Coleman, D. M., Sheetz, K. H., Englesbe, M. J. & Waits, S. A. Aneurysms in abdominal organ transplant recipients. *J. Vasc. Surg.* **59**, 594–598 (2014).
 63. Cronenwett, J. L. *et al.* Actuarial analysis of variables associated with rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery* **98**, 472–83 (1985).
 64. Holt, P. J. E., Poloniecki, J. D., Gerrard, D., Loftus, I. M. & Thompson, M. M. Meta-analysis and systematic review of the relationship between volume and outcome in abdominal aortic aneurysm surgery. *Br. J. Surg.* **94**, 395–403 (2007).
 65. Lo, R. C. *et al.* Relative importance of aneurysm diameter and body size for predicting abdominal aortic aneurysm rupture in men and women. *J. Vasc. Surg.* **59**, 1209–1216 (2014).
 66. Skibba, A. A. *et al.* Reconsidering gender relative to risk of rupture in the contemporary management of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **62**, 1429–1436 (2015).
 67. Soares Ferreira, R. *et al.* Review on management and outcomes of ruptured abdominal aortic aneurysm in women. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. **59**, 195–200 (2018).

68. Nordon, I. M., Hinchliffe, R. J., Loftus, I. M. & Thompson, M. M. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nature Reviews Cardiology* (2011). doi:10.1038/nrcardio.2010.180
69. Jalalzadeh, H. *et al.* Inflammation as a Predictor of Abdominal Aortic Aneurysm Growth and Rupture: A Systematic Review of Imaging Biomarkers. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **52**, 333–342 (2016).
70. Li, H. *et al.* Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets. *J. Immunol. Res.* **2018**, 1–15 (2018).
71. Wassef, M. *et al.* Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: A multidisciplinary research program supported by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *J. Vasc. Surg.* **34**, 730–738 (2001).
72. Hance, K. A., Tataria, M., Ziporin, S. J., Lee, J. K. & Thompson, R. W. Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: Role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J. Vasc. Surg.* (2002). doi:10.1067/mva.2002.120382
73. Steinmetz, E. F., Buckley, C. & Thompson, R. W. Prospects for the medical management of abdominal aortic aneurysms. *Vascular and Endovascular Surgery* (2003). doi:10.1177/153857440303700301
74. Ennis, T. L. *et al.* Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* (2003). doi:10.1016/s0741-5214(03)00125-3
75. Kortekaas, K. E. *et al.* ACE inhibitors potently reduce vascular inflammation, results of an open proof-of-concept study in the abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* **9**, 1–16 (2014).
76. Golledge, A. L. V., Walker, P., Norman, P. E. & Golledge, J. A systematic review of studies examining inflammation associated cytokines in human abdominal aortic aneurysm samples. *Dis. Markers* (2009). doi:10.3233/DMA-2009-0629
77. López-Candales, A. *et al.* Decreased Vascular Smooth Muscle Cell Density in Medial Degeneration of Human Abdominal Aortic Aneurysms. *American Journal of Pathology* **150**, (1997).
78. Nigro, P. *et al.* Cyclophilin A enhances vascular oxidative stress and the development of angiotensin II-induced aortic aneurysms. *Nat. Med.* (2009). doi:10.1038/nm.1958
79. Moñux, G., Serrano, F. J., Vigil, P. & De la Concha, E. G. Role of HLA-DR in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*

- (2003). doi:10.1053/ejvs.2002.1897
80. Halloran, B. G. & Baxter, B. T. Pathogenesis of aneurysms. *Semin. Vasc. Surg.* **8**, 85–92 (1995).
 81. Minion, D. J. *et al.* Elastin Is Increased in Abdominal Aortic Aneurysms. *J. Surg. Res.* (1994). doi:10.1006/jsre.1994.1168
 82. Risteli, L. *et al.* Increased amount of type III pN-collagen in human abdominal aortic aneurysms: Evidence for impaired type III collagen fibrillogenesis. *J. Vasc. Surg.* (2002). doi:10.1067/mva.2000.109743
 83. Delbosc, S. *et al.* Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. proof of concept in rats. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0018679
 84. Thompson, M. M., Jones, L., Nasim, A., Sayers, R. D. & Bell, P. R. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **11**, 464–9 (1996).
 85. Eilenberg, W. *et al.* The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment. *Front. Cardiovasc. Med.* (2015). doi:10.3389/fcvm.2015.00019
 86. Wang, D. H. J. *et al.* Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J. Vasc. Surg.* (2002). doi:10.1067/mva.2001.114813
 87. Choke, E. *et al.* A Review of Biological Factors Implicated in Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* (2005). doi:10.1016/j.ejvs.2005.03.009
 88. Huffman, M. D. *et al.* Functional importance of connective tissue repair during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Surgery* (2000). doi:10.1067/msy.2000.107379
 89. Cohen, J. D. *et al.* Outcome after elective infrarenal aortic aneurysm surgery. *World J. Surg.* **22**, 278–82 (1998).
 90. Choke, E. *et al.* Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. in *Annals of the New York Academy of Sciences* (2006). doi:10.1196/annals.1383.007
 91. Defawe, O. D. *et al.* Gradient of proteolytic enzymes, their inhibitors and matrix proteins expression in a ruptured abdominal aortic aneurysm [1]. *European Journal of Clinical Investigation* (2004). doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01371.x
 92. Filardo, G., Powell, J. T., Martinez, M. A. M. & Ballard, D. J. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2015). doi:10.1002/14651858.CD001835.pub4
 93. Riambau, V., Guerrero, F., Montañá, X. & Gilabert, R. Aneurisma de aorta

- abdominal y enfermedad vascular renal. *Rev. Española Cardiol.* (2011). doi:10.1157/13107121
94. Cherry, K. J. *et al.* Ruptured abdominal aortic aneurysms: The excessive mortality rate of conventional repair. *J. Vasc. Surg.* (2002). doi:10.1067/mva.2001.115604
95. Alcorn, H. G., Wolfson, S. K., Sutton-Tyrrell, K., Kuller, L. H. & O'Leary, D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 963–70 (1996).
96. Johnston, K. W. *et al.* 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. *J. Vasc. Surg.* **13**, 452–8 (1991).
97. Lioudaki, S. *et al.* Advances in determining abdominal aortic aneurysm size and growth. *World J. Radiol.* (2016). doi:10.4329/wjr.v8.i2.148
98. Gutiérrez, D. Fe de errata al artículo 'Recomendaciones de la guía para el diagnóstico y tratamiento del aneurisma de aorta abdominal'. *Angiología* (2016). doi:10.1016/j.angio.2015.09.001
99. Crawford, C. M., Hurtgen-Grace, K., Talarico, E. & Marley, J. Abdominal aortic aneurysm: An illustrated narrative review. *Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics* **26**, 184–195 (2003).
100. Pena, C. S., Schiro, B. J. & Benenati, J. F. Fenestrated Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Tech. Vasc. Interv. Radiol.* **21**, 156–164 (2018).
101. Li, B. *et al.* A systematic review and meta-analysis of the long-term outcomes of endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysm. *J. Vasc. Surg.* (2019). doi:10.1016/j.jvs.2019.01.076
102. Steinmetz, E. F. *et al.* Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann. Surg.* (2005). doi:10.1097/01.sla.0000150258.36236.e0
103. Mastoraki, S. T. *et al.* Treatment with simvastatin inhibits the formation of abdominal aortic aneurysms in rabbits. *Ann. Vasc. Surg.* (2012). doi:10.1016/j.avsg.2011.09.003
104. Gokani, V. J. *et al.* A retrospective study: Factors associated with the risk of abdominal aortic aneurysm rupture. *Vascul. Pharmacol.* (2015). doi:10.1016/j.vph.2014.11.006

105. Takagi, H., Yamamoto, H., Iwata, K., Goto, S. & Umemoto, T. Effects of statin therapy on abdominal aortic aneurysm growth: A meta-analysis and meta-regression of observational comparative studies. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* (2012). doi:10.1016/j.ejvs.2012.06.021
106. Loftus, I. M., Thompson, M. M., Evans, J., Schwalbe, E. & Powell, J. T. Simvastatin Attenuates the Activity of Matrix Metalloprotease-9 in Aneurysmal Aortic Tissue. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* (2007). doi:10.1016/j.ejvs.2007.04.011
107. Salata, K. *et al.* Renin-angiotensin system blockade does not attenuate abdominal aortic aneurysm growth, rupture rate, or perioperative mortality after elective repair. *J. Vasc. Surg.* **67**, 629-636.e2 (2018).
108. Walton, L. J. *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* **100**, 48–54 (1999).
109. Hackam, D. G., Thiruchelvam, D. & Redelmeier, D. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet* (2006). doi:10.1016/S0140-6736(06)69250-7
110. Wilmlink, A. B. M. *et al.* Are antihypertensive drugs associated with abdominal aortic aneurysms? *J. Vasc. Surg.* (2002). doi:10.1067/mva.2002.126550
111. Sweeting, M. J., Thompson, S. G., Brown, L. C., Greenhalgh, R. M. & Powell, J. T. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* (2010). doi:10.1016/j.jvs.2010.02.264
112. Curci, J. A., Petrincic, D., Liao, S., Golub, L. M. & Thompson, R. W. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J. Vasc. Surg.* **28**, 1082–93 (1998).
113. Curci, J. A. *et al.* Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* (2000). doi:10.1016/S0741-5214(00)90163-0
114. Abdul-Hussien, H. *et al.* Doxycycline therapy for abdominal aneurysm: Improved proteolytic balance through reduced neutrophil content. *J. Vasc. Surg.* (2009). doi:10.1016/j.jvs.2008.09.055
115. Mosorin, M. *et al.* Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J. Vasc. Surg.* (2001). doi:10.1067/mva.2001.117891

116. Newby, A. C. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascular Pharmacology* (2012). doi:10.1016/j.vph.2012.01.007
117. Rauch, B. *et al.* Antagonism of the antithrombotic and anti-atherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit. *Br. J. Pharmacol.* (2011). doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01392.x
118. Prasad, K. & Lee, P. *Suppression of Oxidative Stress as a Mechanism of Reduction of Hypercholesterolemic Atherosclerosis by Aspirin. J Cardiovasc Pharmacol Therapeut* **8**, (2003).
119. Tauseef, M., Shahid, M., Sharma, K. K. & Fahim, M. Antioxidative action of aspirin on endothelial function in hypercholesterolaemic rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2008). doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00277.x
120. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration *et al.* Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet (London, England)* **373**, 1849–60 (2009).
121. Czernski, A. *et al.* EXperimental methods of abdominal aortic aneurysm creation in swine as a large animal model. *J. Physiol. Pharmacol.* **64**, 185–192 (2013).
122. Bi, Y. *et al.* Novel experimental model of enlarging abdominal aortic aneurysm in rabbits. *J. Vasc. Surg.* **62**, 1054–1063 (2015).
123. Folkesson, M. *et al.* Differences in cardiovascular toxicities associated with cigarette smoking and snuff use revealed using novel zebrafish models. *Biol. Open* **5**, 970–978 (2016).
124. ECONOMOU, S. G., TAYLOR, C. B., BEATTIE, E. J. & DAVIS, C. B. Persistent experimental aortic aneurysms in dogs. *Surgery* **47**, 21–8 (1960).
125. NABSETH, D. C., MARTIN, D. E., ROWE, M. I., GOTLIEB, L. S. & DETERLING, R. A. Enzymatic destruction of aortic elastic tissue and possible relationship to experimental atherosclerosis. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*. **4**, 11–7 (1963).
126. Anidjar, S. *et al.* Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation* **82**, 973–81 (1990).
127. Yamaguchi, T. *et al.* Morphologic changes in the aorta during elastase infusion in the rat aneurysm model. *J. Surg. Res.* **95**, 161–166 (2001).
128. Patelis, N. *et al.* Animal models in the research of abdominal aortic aneurysms development. *Physiol. Res.* **66**, 899–915 (2017).
129. Gertz, S. D., Kurgan, A. & Eisenberg, D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J. Clin. Invest.* **81**, 649–656 (1988).

130. Freestone, T., Turner, R. J., Higman, D. J., Lever, M. J. & Powell, J. T. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 10–7 (1997).
131. Chiou, A. C., Chiu, B. & Pearce, W. H. Murine Aortic Aneurysm Produced by Periarterial Application of Calcium Chloride. **376**, 371–376 (2001).
132. Daugherty, A., Manning, M. W. & Cassis, L. A. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **105**, 1605–12 (2000).
133. Stegbauer, J. *et al.* Mas receptor deficiency augments angiotensin II-induced atherosclerosis and aortic aneurysm ruptures in hypercholesterolemic male mice. *J. Vasc. Surg.* (2019). doi:10.1016/j.jvs.2018.11.045
134. Liang, E. S. *et al.* PARP-1 (Poly[ADP-Ribose] Polymerase 1) Inhibition protects from ang II (angiotensin II)-induced abdominal aortic aneurysm in mice. *Hypertension* **72**, 1189–1199 (2018).
135. Phie, J. *et al.* A diet enriched with tree nuts reduces severity of atherosclerosis but not abdominal aneurysm in angiotensin II-infused apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* **277**, 28–33 (2018).
136. Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat. Med.* **16**, 396–399 (2010).
137. Wang, M. & Kaufman, R. J. The impact of the endoplasmic on cancer development. *Nat. Publ. Gr.* **14**, 581–597 (2014).
138. Sanson, M. *et al.* Oxidized Low-Density Lipoproteins Trigger Endoplasmic Reticulum Stress in Vascular Cells. *Circ. Res.* **104**, 328–336 (2008).
139. Galán, M. *et al.* Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1063–1075 (2014).
140. Hasty, A. H. & Harrison, D. G. Endoplasmic reticulum stress and hypertension - A new paradigm? *J. Clin. Invest.* **122**, 3859–3861 (2012).
141. Dromparis, P. *et al.* Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation* **127**, 115–125 (2013).
142. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519–529 (2007).
143. Wang, S. & Kaufman, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J. Cell Biol.* **197**, 857–867 (2012).
144. B'Chir, W. *et al.* The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7683–7699 (2013).

145. Myoishi, M. *et al.* Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* **116**, 1226–1233 (2007).
146. Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A. M. & Samali, A. Stress-induced self-cannibalism: On the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2425–2441 (2013).
147. Korsager Larsen, M. & Matchkov, V. V. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Med.* **52**, 19–27 (2016).
148. Emeto, T. I., Moxon, J. V., Au, M. & Golledge, J. Oxidative stress and abdominal aortic aneurysm: potential treatment targets. *Clin. Sci.* **130**, 301–315 (2016).
149. Sack, M. N. *et al.* HHS Public Access. **70**, 196–211 (2018).
150. Sorescu, D. *et al.* Superoxide production and expression of Nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1429–1435 (2002).
151. Preuss, C. *et al.* Angiotensin II Induces Endothelial Xanthine Oxidase Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 943–948 (2007).
152. Ballinger, S. W. *et al.* Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation* **106**, 544–549 (2002).
153. Li, H. & Förstermann, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **13**, 161–7 (2013).
154. Madamanchi, N. R., Vendrov, A. & Runge, M. S. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 29–38 (2005).
155. Kuhn, H., Banthiya, S. & van Leyen, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 308–330 (2015).
156. Schroeffer, G. J. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
157. Björkhem, I. & Diczfalusy, U. Oxysterols: Friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 734–742 (2002).
158. Olkkonen, V. M., Béaslas, O. & Nissilä, E. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* **2**, 76–103 (2012).
159. Wang, M. *et al.* Plasma 7-ketocholesterol levels and the risk of incident cardiovascular events. *Heart* **103**, 1788–1794 (2017).
160. Gosselet, F., Saint-Pol, J. & Fenart, L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: Implications for Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 687–691 (2014).
161. Narayanaswamy, R. *et al.* Simultaneous determination of oxysterols,

- cholesterol and 25-hydroxy-vitamin D3 in human plasma by LC-UV-MS. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
162. Mukhopadhyay, S. *et al.* Interdependence of oxysterols with cholesterol profiles in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **23**, 792–801 (2017).
163. Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. & Ohsumi, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**, 301–312 (1992).
164. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–74 (1993).
165. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).
166. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).
167. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 460–473 (2013).
168. Boya, P., Esteban-Martínez, L., Serrano-Puebla, A., Gómez-Sintes, R. & Villarejo-Zori, B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog. Retin. Eye Res.* **55**, 206–245 (2016).
169. Ravanan, P., Srikumar, I. F. & Talwar, P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci.* **188**, 53–67 (2017).
170. Torisu, K. *et al.* Intact endothelial autophagy is required to maintain vascular lipid homeostasis. *Aging Cell* **15**, 187–191 (2016).
171. Clément, M. *et al.* P5 Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity in Dissecting Aortic Aneurysms. *Cardiovasc. Res.* **114**, S2–S2 (2018).
172. Torisu, T. *et al.* Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat. Med.* **19**, 1281–7 (2013).
173. Salabei, J. K. & Hill, B. G. Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 693–703 (2013).
174. Ding, Z. *et al.* Regulation of autophagy and apoptosis in response to ox-LDL in vascular smooth muscle cells, and the modulatory effects of the microRNA hsa-let-7g. *Int. J. Cardiol.* **168**, 1378–1385 (2013).
175. Vlahakis, A. & Debnath, J. The Interconnections between Autophagy and Integrin-Mediated Cell Adhesion. *J. Mol. Biol.* **429**, 515–530 (2017).
176. Mialet-Perez, J. & Vindis, C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system. *Essays Biochem.* **61**, 721–732 (2017).
177. Hansen, M., Rubinsztein, D. C. & Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 579–

- 593 (2018).
178. Chen, H. & Chan, D. C. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 169–176 (2009).
179. Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **120**, 1812–1824 (2017).
180. Smirnova, E., Shurland, D. L., Ryazantsev, S. N. & Van Der Bliek, A. M. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.* **143**, 351–358 (1998).
181. Susan, C. *et al.* Mitochondrial Motility and Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 3000–3011 (2012).
182. Singh, S. & Sharma, S. Dynamin-related protein-1 as potential therapeutic target in various diseases. *Inflammopharmacology* **25**, 383–392 (2017).
183. Lim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Preconditioning and postconditioning : the essentialLim, S. Y., Davidson, S. M., Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2007). Preconditioning and postconditioning : the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 75(3), 5. *Cardiovasc Res* **75**, 530–535 (2007).
184. Uittenbogaard, M. & Chiaramello, A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5574–93 (2014).
185. Li, P. A., Hou, X. & Hao, S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **95**, 2025–2029 (2017).
186. Timmins, J. M. *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J. Clin. Invest.* **119**, 2925–2941 (2009).
187. Guarente, L. Mitochondria-A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell* **132**, 171–176 (2008).
188. Gargiulo, S., Gamba, P., Testa, G., Leonarduzzi, G. & Poli, G. The role of oxysterols in vascular ageing. *J. Physiol.* **594**, 2095–2113 (2016).
189. Hayden, J. M. *et al.* Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J. Lipid Res.* **43**, 26–35 (2002).
190. Soler, M., Camacho, M., Escudero, J. R., Iñiguez, M. A. & Vila, L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ. Res.* **87**, 504–7 (2000).
191. Khan, S., Komarya, S. K. & Jena, G. Phenylbutyrate and β -cell function: Contribution of histone deacetylases and ER stress inhibition. *Epigenomics* **9**, 711–720 (2017).

192. Vang, S., Longley, K., Steer, C. J. & Low, W. C. The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Glob. Adv. Heal. Med.* **3**, 58–69 (2014).
193. Laurindo, F. R. M., Fernandes, D. C. & Santos, C. X. C. Chapter 13 Assessment of Superoxide Production and NADPH Oxidase Activity by HPLC Analysis of Dihydroethidium Oxidation Products. in *Methods in Enzymology* **441**, 237–260 (Academic Press Inc., 2008).
194. Samhan-Arias, A. K. *et al.* Cytochrome b5 reductase is the component from neuronal synaptic plasma membrane vesicles that generates superoxide anion upon stimulation by cytochrome c. *Redox Biol.* **15**, 109–114 (2018).
195. Galán, M. *et al.* Induction of histone deacetylases (HDACs) in human abdominal aortic aneurysm: therapeutic potential of HDAC inhibitors. *Dis. Model. Mech.* **9**, 541–52 (2016).
196. Helmschrodt, C. *et al.* Fast LC-MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. *Clin. Chim. Acta* (2013). doi:10.1016/j.cca.2013.06.022
197. Luchetti, F. *et al.* 7-Ketocholesterol and 5,6-secosterol induce human endothelial cell dysfunction by differential mechanisms. *Steroids* **99**, 204–211 (2015).
198. Bootcov, M. R. *et al.* MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 11514–9 (1997).
199. Böttner, M. *et al.* Characterization of the rat, mouse, and human genes of growth/differentiation factor-15/macrophage inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1). *Gene* **237**, 105–111 (1999).
200. Koopmann, J. *et al.* *Serum Macrophage Inhibitory Cytokine 1 as a Marker of Pancreatic and Other Periampullary Cancers.* (2004).
201. Xu, J. *et al.* GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ. Res.* **98**, 342–350 (2006).
202. Emmerson, P. J., Duffin, K. L., Chintharlapalli, S. & Wu, X. GDF15 and Growth Control. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
203. Choe, N. *et al.* The microRNA miR-124 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by targeting S100 calcium-binding protein A4 (S100A4). *FEBS Letters* **591**, 1041–1052 (2017).
204. Sudo, R., Sato, F., Azechi, T. & Wachi, H. 7-Ketocholesterol-induced lysosomal dysfunction exacerbates vascular smooth muscle cell calcification via oxidative stress. *Genes to Cells* **20**, 982–991 (2015).

205. Xu, M. *et al.* Contribution of Nrf2 to Atherogenic Phenotype Switching of Coronary Arterial Smooth Muscle Cells Lacking CD38 Gene. *Cell. Physiol. Biochem.* **37**, 432–444 (2015).
206. Zarrouk, A. *et al.* Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158 N murine oligodendrocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **169**, 29–38 (2017).
207. Samson, R. Can Pharmacologic Agents Slow Abdominal Aortic Aneurysm Growth? *Semin. Vasc. Surg.* **25**, 25–28 (2012).
208. R. Dodd, B. & A. Spence, R. Doxycycline Inhibition of Abdominal Aortic Aneurysm Growth - A Systematic Review of the Literature. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **9**, 471–478 (2011).
209. Yoshimura, K. *et al.* Inhibitory effect of statins on inflammation-related pathways in human abdominal aortic aneurysm tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 11213–11228 (2015).
210. van der Meij, E. *et al.* A Clinical Evaluation of Statin Pleiotropy: Statins Selectively and Dose-Dependently Reduce Vascular Inflammation. *PLoS One* **8**, (2013).
211. Prola, A. *et al.* ER stress induces cardiac dysfunction through cardiomyocytes architectural modifications and alteration of mitochondrial function. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* **10**, 189 (2018).
212. Oh-hashi, K. *et al.* CRELD2 is a novel endoplasmic reticulum stress-inducible gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **387**, 504–510 (2009).
213. Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E. & Kopito, R. R. OS-9 and GRP94 deliver mutant α 1-antitrypsin to the Hrd1?SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat. Cell Biol.* **10**, 272–282 (2008).
214. Horimoto, S. *et al.* The unfolded protein response transducer ATF6 represents a novel transmembrane-type endoplasmic reticulum-associated degradation substrate requiring both mannosyl trimming and SEL1L protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 31517–31527 (2013).
215. Qin, Y. *et al.* Tauroursodeoxycholic Acid Attenuates Angiotensin II Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-deficient Mice by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **53**, 337–345 (2017).
216. Li, Y. *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress signaling pathway: A new mechanism of statins to suppress the development of abdominal aortic aneurysm. *PLoS One* **12**, (2017).
217. Ni, X. Q. *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin1-53

- attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in ApoE KO Mice. *Endocrine* **62**, 90–106 (2018).
218. Santos, C. X. C., Tanaka, L. Y., Wosniak, J. & Laurindo, F. R. M. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2409–2427 (2009).
219. Malhotra, J. D. & Kaufman, R. J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2277–2294 (2007).
220. Dikalova, A. E. *et al.* Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ. Res.* **107**, 106–116 (2010).
221. Thomas, M. *et al.* Deletion of p47phox attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **114**, 404–413 (2006).
222. Miller, F. J. *et al.* Oxidative Stress in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 560–565 (2002).
223. Guzik, B. *et al.* Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms - Association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *Int. J. Cardiol.* **168**, 2389–2396 (2013).
224. Tabas, I. & Ron, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology* **13**, 184–190 (2011).
225. Sinha, I. *et al.* Mitochondrial-dependent apoptosis in experimental rodent abdominal aortic aneurysms. *Surgery* **138**, 806–811 (2005).
226. Bonnard, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 789–800 (2008).
227. Chevtzoff, C. *et al.* Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **285**, 1733–1742 (2010).
228. Gabrielson, M. *et al.* Altered PPAR γ Coactivator-1 Alpha Expression in Abdominal Aortic Aneurysm: Possible Effects on Mitochondrial Biogenesis. *J. Vasc. Res.* **53**, 17–26 (2016).
229. Lin, N. *et al.* Determination of 7-ketocholesterol in plasma by LC-MS for rapid diagnosis of acid SMase-deficient Niemann-Pick disease. *J. Lipid Res.* **55**, 338–343 (2014).
230. Marwarha, G. & Ghribi, O. Does the oxysterol 27-hydroxycholesterol underlie Alzheimer's disease-Parkinson's disease overlap? *Experimental Gerontology*

- 68**, 13–18 (2015).
231. Song, J. *et al.* Association of plasma 7-ketocholesterol with cardiovascular outcomes and total mortality in patients with coronary artery disease. *Circ. Res.* **120**, 1622–1631 (2017).
232. Pedruzzi, E. *et al.* NAD(P)H Oxidase Nox-4 Mediates 7-Ketocholesterol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10703–10717 (2004).
233. Lutjohann, D. *et al.* Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9799–9804 (2002).
234. Glass, C. K. & Saijo, K. Immunology: Oxysterols hold T cells in check. *Nature* **455**, 40–1 (2008).
235. Adiguzel, Z. *et al.* Evaluation of apoptotic molecular pathways for smooth muscle cells isolated from thoracic aortic aneurysms in response to oxidized sterols. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 7875–7884 (2014).
236. Sanda, G. M. *et al.* Oxidized LDL-Exposed Human Macrophages Display Increased MMP-9 Expression and Secretion Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Cell. Biochem.* **118**, 661–669 (2017).
237. Senft, D. & Ronai, Z. A. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends in Biochemical Sciences* **40**, 141–148 (2015).
238. Arca, M. *et al.* Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: Reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 698–705 (2007).
239. Razani, B. *et al.* Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab.* **15**, 534–544 (2012).
240. Jones, R. M. & Petermann, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. *Biochem. J.* **443**, 13–26 (2012).
241. Monteleone, J. P. R. *et al.* Population pharmacokinetic modeling and dosing simulations of nitrogen-scavenging compounds: disposition of glycerol phenylbutyrate and sodium phenylbutyrate in adult and pediatric patients with urea cycle disorders. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 699–710 (2013).
242. Stiehl, A., Raedsch, R., Rudolph, G. & Walker, S. Effect of ursodeoxycholic acid on biliary bile acid and bile lipid composition in gallstone patients. *Hepatology* **4**, 107–11
243. Hofmann, A. F. Medical treatment of cholesterol gallstones by bile desaturating agents. *Hepatology* **4**, 199S-208S
244. Lee, J. K., Borhani, M., Ennis, T. L., Upchurch, G. R. & Thompson, R. W.

- Experimental abdominal aortic aneurysms in mice lacking expression of inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1393–401 (2001).
245. Manning, M. W., Cassis, L. A., Huang, J., Szilvassy, S. J. & Daugherty, A. Abdominal aortic aneurysms: fresh insights from a novel animal model of the disease. *Vasc. Med.* **7**, 45–54 (2002).
246. Laser, A. *et al.* Differential gender- and species-specific formation of aneurysms using a novel method of inducing abdominal aortic aneurysms. *J. Surg. Res.* **178**, 1038–1045 (2012).
247. Bode, M. *et al.* Inaccurately Assembled Cytochrome c Oxidase Can Lead to Oxidative Stress-Induced Growth Arrest. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1597–1612 (2012).
248. Hanna, R. A. *et al.* Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* **287**, 19094–19104 (2012).
249. Liu, K. E. & Frazier, W. A. Phosphorylation of the BNIP3 C-terminus inhibits mitochondrial damage and cell death without blocking autophagy. *PLoS One* **10**, (2015).
250. Rana, A. *et al.* Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
251. Lim, S. & Park, S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* **47**, 1–7 (2014).
252. Ma, Y., Mouton, A. J. & Lindsey, M. L. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl. Res.* **191**, 15–28 (2018).

