

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**Utilidad del PET-TC en la valoración del
crecimiento del aneurisma de aorta abdominal y
su relación con los cambios en el metabolismo
energético**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángel Galindo García

DIRECTORES

Antonio José López Farré
Francisco Javier Serrano Hernando
Guillermo Moñux Ducajú

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**UTILIDAD DEL PET-TC EN LA VALORACIÓN DEL
CRECIMIENTO DEL ANEURISMA DE AORTA
ABDOMINAL Y SU RELACIÓN CON LOS
CAMBIOS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO**

TESIS DOCTORAL

ANGEL GALINDO GARCIA

MADRID, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**UTILIDAD DEL PET-TC EN LA VALORACIÓN DEL
CRECIMIENTO DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL
Y SU RELACIÓN CON LOS CAMBIOS EN EL
METABOLISMO ENERGÉTICO**

TESIS DOCTORAL

ANGEL GALINDO GARCIA

DIRECTORES DE TESIS:

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

MADRID, 2016

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por los doctores Antonio José López Farré, Francisco Javier Serrano Hernando y Guillermo Moñux Ducajú y financiada por una Beca de Investigación de la Fundación de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascolar

A mi MUJER, con
mayúsculas, siempre a mi
lado, siempre cómplice en
lo bueno y lo malo de
nuestra vida. Para que me
 siga llevando la contraria
 muchos años...

A mis hijos, por ellos se
es capaz de hacer
cualquier cosa

AGRADECIMIENTOS

A Mercedes, por ser tan apasionada en todo lo que hace, en todo lo que siente, en todo lo que transmite, porque me cambiaste la vida....

A Angel y Alberto, porque a pesar de ser muy distintos entre ellos, me recuerdan tanto a mí ...

A mis padres, porque hasta que uno no crece no se da cuenta de que hay que agradecerles tantas cosas...

A mis hermanos, porque aunque estén lejos y no pasemos mucho tiempo juntos sé que siempre están cerca de mí...

A mis amigos de siempre, por todos los momentos vividos y los que nos quedan...

A mis directores: a Guillermo, por su auténtica sencillez, sus ánimos y su sonrisa cuando parece que nos desborda el trabajo. A Javier, mi eterno agradecimiento por la oportunidad que me dio para pertenecer a esa gran familia del Clínico. A Antonio, por la humildad con la que te transmite su sabiduría (menos cuando habla de su Atleti...).

A los que me han ayudado con esta tesis: a Javi, por aclarar todas mis dudas, y a la Unidad de Investigación al completo por su tremenda labor. A Manuela, por su increíble capacidad de trabajo y su paciencia conmigo. A Roberto, por el interés que mostró desde el primer día. A Miguel, por echarme una mano ahora y siempre.

A mis compañeros del hospital: especialmente a Rodrigo, porque me acogió como un hermano cuando llegué. A Luis, porque debajo de su aparente seriedad se esconde un magnífico amigo. A Isaac, por ese ímpetu a la hora de vivir que nos arrastra a todos. A Antonio, por su disposición cuando necesito cualquier cosa. A Teresa, por sus consejos de “madre”. A Charli, por esos momentos irrepetibles en quirófano...

Al resto de residentes actuales, Pablo, Iñaki, Maday, Ferrán, Oscar, y también a los que se marcharon, Sergio, Ana, Manu, Sara, Capi, Rafa, Ana, Cari y Estrella. Convivir con ellos te rejuvenece y hace que no bajes la guardia...

A todos los demás que nos hacen (o hicieron) la vida diaria más fácil con su trabajo, alegría y dedicación: Lola, Pilar, Rosalía, Maribel, Mise, Peque, Piluca, Angelines, Piedad, Ramoni, Noelia, personal de quirófano y planta. Si se me olvida alguien que me perdone...

A mis antiguos compañeros de La Paz, porque con ellos me crié en esto de la cirugía vascular...

Gracias a todos

ABREVIATURAS

- 2-DE: Electroforesis bidimensional.
- AAA: Aneurisma de aorta abdominal.
- AAI: Aneurisma de aorta abdominal inflamatorio
- AAAP: *Aneurysm associated protein*; proteína asociada a los aneurismas.
- AAT: Aneurisma de aorta torácica
- AATA: Aneurisma de aorta toracoabdominal
- AcilCoaDH: Acil coenzima A deshidrogenasa
- ADP: Adenosín Difosfato
- Arg: Arginina.
- ATP: Adenosín Trifosfato
- BCA: Ácido bicinconínico
- BSA: Albúmina de suero bovino
- CML: Células musculares lisas
- CoA: Coenzima A
- CoQ: Coenzima Q
- CPT: Carnitina palmitoiltransferasa
- DPA714: Antagonista del receptor de benzodiazepina periférica
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EMMPRIN: *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*
- EVAR: *Endovascular aortic aneurysm repair*, reparación endovascular de aneurisma aórtico.
- F 0-1 : Factores de acoplamiento
- FAD: Flavín adenina dinucleótido

- FCH: Fluorometilcolina
- FDG: Fluorodeoxiglucosa
- Fig: Figura
- GLUTs: *Proteínas transportadoras de glucosa*, proteínas transportadoras de glucosa
- GTP: Guanosín trifosfato
- HDL: *high-density lipoprotein*, lipoproteína de alta densidad
- IDL: *Interactive Data Language*, lenguaje interactivo de datos
- IGF: Factor de crecimiento de Insulina
- IL: Interleukina
- IPG: *Isoelectric Phocusing Gradient*
- Lys: Lisina.
- LDH: lactato deshidrogenasa
- MALDI: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*.
- MAs: Miliamperios
- MBq: Megabecquerels
- MDH: Malato deshidrogenasa
- MIP-2: *Macrophage inflammatory protein 2*, proteína inflamatoria de macrófagos 2
- MMP: *Matrix metalloproteinase*, metaloproteinasa de la matriz
- MS: *Mass Spectrometry*, espectrometría de masas.
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleotido
- PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*, inhibidor 1 del activador del plasminógeno
- PDH: Piruvato deshidrogenasa

- PVDF: *Polyvinylidene difluoride*, fluoruro de polivinilideno
- PCR: Proteína C Reactiva
- PEP: Fosfoenolpirúvico
- PET: Tomografía por emisión de positrones
- PRX-1: Peroxiredoxina-1
- RECK: *Reversión-inducing-cysteine-rich proteína with kazal motifs*
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear
- ROI: *Region of interest*, región de interés
- SDS: Dodecil sulfato sódico
- sTWEAK: *soluble Tumor Necrosis factor-like Weak Inducer of Apoptosis*
- SUVmax: *Maximum Standardized Uptake Value*, valor máximo de captación estándar
- TBR: *Target of background ratio*. Ratio de retorno en órgano diana
- TC: Tomografía Computerizada
- TGF: Factor de crecimiento transformante
- TN-C: Tenascina-C
- TFA: *TriFluoroAcetic acid*, ácido trifluoroacético.
- TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinase*, inhibidor tisular de la metaloproteinasa.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- TOF: *Time of Flight*, tiempo de vuelo.
- tPA: *Tissue Plasminogen activator*, activador tisular del plasminógeno
- UCP: *Uncoupling proteins*, proteínas desacoplantes
- uPA: *urokinase-type plasminogeno activator*, activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

- VPN: Valor predictivo negativo
- VPP: Valor predictivo positivo
- WB: Western Blot

ÍNDICE

I. RESUMEN-SUMMARY	25
II. INTRODUCCIÓN	33
II.A. Aneurismas de aorta abdominal.	33
II.A.1. Definición de aneurisma arterial.	33
II.A.2. Epidemiología	33
II.A.3. Historia natural de los aneurismas de aorta abdominal.	34
II.B. Patogenia de los AAA.	36
II.B.1. Teoría arterioesclerótica.	36
II.B.2. Teoría mecánica.	37
II.B.3. Teoría inmunogenética	38
II.B.3.1. Introducción.	38
II.B.3.2. Diferencias entre los AAA y la arteriosclerosis aórtica.	38
II.B.3.3. Papel de las metaloproteinasas.	43
II.B.4. AAA y susceptibilidad genética	44
II.B.5. Teoría actual sobre la patogenia de los AAA.	46
II.C. Tomografía por emisión de positrones (PET) y aneurisma de aorta infrarrenal	48
II.C.1. Biomarcadores para el aneurisma de aorta infrarrenal.	48
II.C.2. Tomografía por emisión de positrones (PET) y 18-FDG.	50
II.C.3. PET-TC y enfermedad arterial.	52
II.D. Metabolismo celular de los hidratos de carbono.	55
II.D.1. Glucolisis.	55
II.D.2. Ciclo de Krebs.	56
II.D.3. Vía anaerobia. Formación de lactato.	59

II.D.4. Fosforilación oxidativa. ATP sintasa. Proteínas desacopladoras	60
II.D.5. Beta oxidación de ácidos grasos. Proteínas transportadoras.	-- 63
II.E. Proteómica.	----- 67
III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	----- 73
IV. OBJETIVOS	----- 75
V. MATERIAL Y MÉTODOS	----- 77
V.A. Selección de pacientes.	----- 77
V.B. Realización del PET-TC.	----- 79
V.C. Obtención de muestras aórticas	----- 82
V.D. Determinación de expresión de proteínas.	----- 82
V.D.1. Western Blot.	----- 83
V.D.1.1. Material empleado.	----- 83
V.D.1.2. Preparación de las muestras.	----- 84
V.D.1.3. Electroforesis en gel.	----- 85
V.D.1.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas.	----- 86
V.D.1.5. Detección de proteínas.	----- 89
V.D.1.6. Análisis.	----- 91
V.E. Estudio estadístico.	----- 92
VI. RESULTADOS	----- 95
VI.A. Características basales de los pacientes y de los AAA.	----- 95
VI.B. Diferencias en las proteínas implicadas en el metabolismo energético celular.	----- 97
VII. DISCUSIÓN	----- 105
VII.A. Biomarcadores en la patogenia del AAA.	----- 105
VII.B. Contribución del PET-TC en la evaluación del AAA	----- 109

VII.B.1. PET-TC y enfermedad arterial-----	110
VII.B.2. PET-TC y proceso inflamatorio en el AAA-----	114
VII.C. Estudios previos de proteómica en AAA. -----	134
VII.D. Metabolismo energético celular en pared aneurismática. -----	142
VII.E. Aportación de nuestro estudio. -----	145
VII.F. Limitaciones del estudio. -----	155
VIII. CONCLUSIONES -----	159
IX. BIBLIOGRAFÍA -----	161

I.- RESUMEN-SUMMARY

UTILIDAD DEL PET-TC EN LA VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL Y SU RELACIÓN CON LOS CAMBIOS EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO

INTRODUCCIÓN

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) constituyen una grave patología cuya rotura conlleva una elevada mortalidad. En la evolución de los AAA el crecimiento inicial suele ser lento y progresivo, pero posteriormente puede acelerarse y llegar a la rotura. Actualmente el diámetro del aneurisma es el factor más determinante para valorar el riesgo de rotura, por lo que en los AAA de pequeño tamaño el manejo suele ser conservador, aunque se ha demostrado que también pueden llegar a la fatal complicación. En el momento actual se desconoce por qué unos AAA desarrollan un crecimiento más rápido, si bien parece haberse demostrado que éstos presentan una mayor actividad inflamatoria en su pared. Sin embargo, se desconocen cuáles son los factores implicados en ese incremento de actividad metabólica, dentro de los diferentes procesos implicados en el metabolismo energético (metabolismo aerobio y anaerobio de la glucosa, beta-oxidación de ácidos grasos, fosforilación oxidativa).

El PET-TC es un método diagnóstico habitualmente utilizado en patología oncológica buscando zonas de hipercaptación tumoral. El substrato más habitual es el 18-fluorodeoxiglucosa (18-FDG), muy útil para detectar actividad tumoral pero también para actividad inflamatoria. Diversos autores

han demostrado que existe una mayor captación de 18-FDG mediante el PET-TC en la pared aneurismática en determinados pacientes, lo que implica un incremento de actividad metabólica asociada a una elevada densidad de células inflamatorias en la pared, conllevando un mayor riesgo de expansión y rotura. Aunque otros autores dudan de esta correlación, la captación de 18-FDG mediante el PET-TC en los AAA se postula como un posible biomarcador de crecimiento de los AAA.

HIPÓTESIS

La cuantificación de la expresión de determinadas proteínas que actúan a nivel de dicho metabolismo celular en la pared aneurismática, en aquellos pacientes con una mayor captación de 18-FDG, podría ayudar a comprender el proceso por el cual estos pacientes pueden presentar un mayor crecimiento del AAA. La identificación de la alteración en la expresión estas proteínas podría suponer un avance en cuanto a la utilidad del PET-TC para valorar una mayor probabilidad de expansión y rotura del AAA.

OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio consisten en comprobar si existe captación de 18-FDG mediante PET-TC en pacientes con AAA, que podría corresponder a un aumento de actividad metabólica en la pared aneurismática, y evaluar si esa captación de 18-FDG se correlaciona con factores de riesgo cardiovascular o del propio aneurisma, como su tamaño o crecimiento del mismo. Por otro lado, determinar si existen diferencias en la expresión de las principales proteínas implicadas en los diferentes procesos implicados en el metabolismo energético celular en la pared aneurismática con captación de 18-FDG frente a

la pared que no presenta captación, a diferentes niveles (metabolismo aerobio, anaerobio, beta-oxidación y fosforilación oxidativa)

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 20 pacientes diagnosticados de aneurisma de aorta abdominal con indicación quirúrgica electiva candidatos a cirugía abierta convencional. Se les realizó un PET-TC tras la administración de 18-FDG, y se valoró la captación en la pared aneurismática mediante la SUVmax (*Standard Uptake Value maxima*), definiéndose como aumentada un valor >2.5 . Posteriormente se obtuvieron muestras de tejido aórtico aneurismático en quirófano. En aquellos pacientes que no presentaron captación aumentada, se obtuvo un fragmento de pared aórtica de la cara anterior del aneurisma. En los casos en los que se demostró captación elevada, se recogieron dos muestras (una de la zona de mayor captación, y la segunda de una zona distante sin captación). La expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo energético, como lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato deshidrogenasa (PDH), malato deshidrogenasa (MDH), acil CoenzimaA deshidrogenasa (Acil CoA DH), carnitina palmitoiltransferasas (CPTs), la proteína desacoplante 1 (UCP-1) y ATP sintasa fueron analizadas por Western-blot.

RESULTADOS

En 5 de los 20 pacientes se demostró captación elevada. Por tanto, se obtuvieron 25 muestras, 5 en zonas de captación elevada y 20 en zonas sin ella. No se han encontrado diferencias entre ambos grupos respecto a factores de riesgo cardiovascular, sexo o edad, aunque sí se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a crecimiento demostrado

del AAA (grupo captación 80% vs grupo no captación 20%, $p=0.018$) con un RR de 7,4 [IC 95%(1,02-54.31)]. El diámetro aórtico ha sido menor en el grupo captación (53.80 ± 9.09 mm vs 60.87 ± 8.48 mm) aunque sin significación estadística. Respecto a la expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo energético, no ha habido diferencias en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo aerobio ni anaerobio. Se apreció en el grupo captación una reducción significativa en la expresión de acil-CoA DH (32.80 ± 8.05 UA vs 55.58 ± 4.28 , $p=0.049$) y de CPT-II (12.68 ± 4.73 UA vs 38.30 ± 3.78 , $p=0.001$), sin diferencias en la CPT-I. Por último, se demostró un aumento significativo en el grupo captación en la expresión de UCP-1 ($138.64\pm 26,57$ UA vs 55.05 ± 11.12 , $p=0.005$), así como una disminución en la expresión de ATP sintasa (10.17 ± 2.67 UA vs 20.11 ± 4.01), aunque sin significación estadística.

CONCLUSIONES

En determinados aneurismas de aorta abdominal existe un incremento de la captación de 18-FDG en el PET-TC, que en nuestra serie se correlaciona con un crecimiento reciente del diámetro del aneurisma aórtico.

La alteración del metabolismo energético en la pared aórtica con hipercaptación no se correlaciona con cambios significativos en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo aeróbico ni anaeróbico de la glucosa. Existe una alteración del metabolismo en la beta-oxidación de ácidos grasos, ya que está disminuida de manera significativa la expresión de Acil-CoA DH y CPT-II. Se ha demostrado un aumento significativo en la expresión de la proteína de UCP-1 en las muestras de pared aórtica que presentan

captación de 18-FDG elevada. Esto sugeriría un desacoplamiento de la cadena de fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP por la mitocondria.

La captación de 18-FDG mediante el PET-TC podría considerarse un potencial biomarcador para detectar aquellos pacientes cuyo aneurisma de aorta abdominal presentan una alteración metabólica que conlleve su crecimiento y mayor riesgo de potencial rotura.

PET-CT UTILITY TO ASSESS THE ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM GROWTH AND ITS RELATIONSHIP WITH CHANGES IN ENERGETIC METABOLISM.

INTRODUCTION

The abdominal aortic aneurysm (AAA) is a severe pathology, which rupture is associated with a high mortality. In the early evolution the growth rate is usually slow and progressive, but later it can accelerate and lead to rupture. Actually the diameter of the aneurysm is the most important factor to consider the risk of rupture, so conservative management is preferred for small aneurysms, although they can also lead to the fatal complication. It remains unknown why some AAA develop a faster growth, but an increased inflammatory activity in the aortic wall has been demonstrated in these cases. However, the factors involved in that increased metabolic activity remain unknown, about the different processes involved in the energetic metabolism (aerobic and anaerobic metabolism of glucose, beta-oxidation of fatty acids, oxidative phosphorylation)

PET-CT is a diagnostic method usually employed in neoplastic pathology to find areas of malignant cells uptake. The most widely applied substrate is the

18-fluorodeoxyglucose (18-FDG), very useful to detect tumoral activity but inflammatory activity too. It's been demonstrated that in some cases there is an increased 18-FDG uptake by PET-CT in the aneurysmal wall, related to an increased metabolic activity associated to a high density of inflammatory cells in the wall, leading to a higher risk of expansion and rupture. Although another authors don't agree about this correlation, 18-FDG uptake by PET-CT is presented as a possible biomarker in the AAA growth.

HYPOTHESIS

The measurement of the expression of proteins related to the cellular metabolism in the aneurismal wall, in those patients who present an increased 18-FDG uptake by PET-CT, could help to understand why they can develop an accelerated AAA growth. Identifying differences in expression of these proteins could lead to advance about the utility of PET-CT to assess a higher AAA expansion and rupture.

OBJECTIVES

The purpose of this study was to check the 18-FDG uptake by PET-CT in patients with AAA, that could be related to an increased metabolic activity in the aneurismal wall, and evaluate whether there is a correlation between this uptake with cardiovascular risk factors, or aneurysm diameter and growth. In addition, to determine whether differences exist in the expression levels of the main proteins involved in the energetic metabolism (aerobic and anaerobic metabolism of glucose, beta-oxidation of fatty acids, oxidative phosphorylation) in patients with an increased 18-FDG uptake

MATERIAL AND METHODS

20 patients with a diagnosed AAA with elective surgical indication for open surgery were selected. A 18-FDG PET-CT was performed, and the uptake in the aneurismal was assessed by the SUVmax (*maximum Standard Uptake Value*), an uptake >2.5 was considered increased. Aneurysmal aortic tissue samples were obtained in the operating room. One sample was obtained from the anterior wall of the aneurysm in patients without increased uptake. In case of increased uptake, two samples were collected (one of them from the highest uptake site and the second one from a distant size). The expression of the proteins involved in the cellular metabolism, as lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate dehydrogenase (PDH), malate dehydrogenase (MDH), acetyl coenzyme-A dehydrogenase, carnitine palmitoyltransferases (CPTs), uncoupling protein 1 (UCP-1) and ATP synthase were analyzed using Western-blot.

RESULTS

5 patients showed an increased uptake. Therefore 25 samples were collected, 5 of them in uptake sites, and 20 in sites with no uptake. We found no differences in the distribution of cardiovascular risk factors, age or sex between both groups. There was a statistical significant difference regarding demonstrated growth of the AAA (80% in uptake group vs 20%, $p=0.018$) with a RR 7,4[IC 95%(1,02-54.31)]. The uptake group showed a lower aortic diameter (53.80 ± 9.09 mm vs 60.87 ± 8.48 mm) although the difference did not reach statistical significance. With reference to proteins involved in energetic metabolism, we observed no differences regarding to the expression of proteins

related to aerobic and anaerobic metabolism. Levels of expression Acil-CoA DH (32.80 ± 8.05 UA vs 55.58 ± 4.28 , $p=0.049$) and CPT-II (12.68 ± 4.73 UA vs 38.30 ± 3.78 , $p=0.001$) were significantly lower in the uptake group, CPT-I showed no differences. Significantly higher levels of expression of UCP-1 were observed in the uptake group ($138.64 \pm 26,57$ UA vs 55.05 ± 11.12 , $p=0.005$), with lower levels of ATP synthase (10.17 ± 2.67 UA vs 20.11 ± 4.01), but with no statistical significance.

CONCLUSIONS

There is an increased uptake of 18-FDG by PET-CT in some abdominal aortic aneurysms. In our study, there is a correlation between this uptake and a recent growth of the AAA diameter.

The changes in the energetic metabolism in the aneurismal wall are not related to significant alterations in the expression of proteins involved in aerobic or anaerobic metabolism of glucose. Beta-oxidation of fatty acids is altered, as the expression of Acil-CoA DH y CPT-II is lower. The expression of UCP-1 in the increased 18-FDG uptake aneurisma wall samples is a significantly increased. It suggests an uncoupling of the oxidative phosphorylation chain and a diminished ATP synthesis

II. INTRODUCCIÓN

II.A. Aneurismas de aorta abdominal

II.A.1. Definición de aneurisma arterial

Se denomina aneurisma a una dilatación localizada y permanente de una arteria que la lleva a tener un diámetro igual o superior al 150% del diámetro del segmento arterial adyacente sano. Pueden ocurrir en cualquier arteria del organismo, siendo la aorta abdominal la localización más frecuente (1)

II.A.2. Epidemiología

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) afectan fundamentalmente a pacientes mayores de 50 años, con una prevalencia de 2 a 6 veces mayor en hombres que en mujeres, y de 2 a 3 veces más frecuente en la raza caucásica respecto a la negra⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾. La prevalencia de los aneurismas de aorta abdominal en la población mayor de 65 años es de 7.6% para hombres y 1.3% para mujeres según un estudio realizado por Scott et al en la población de Reino Unido mediante screening de 5.394 personas sin sospecha de patología aórtica⁽⁵⁾. Estudios más recientes cifran la prevalencia global de aneurisma de aorta abdominal entre el 5 y el 10% de los hombres con edades comprendidas entre los 65 y 79 años⁽⁶⁾.

Dentro de las potenciales complicaciones de los aneurisma de aorta (embolización distal del trombo mural, infección, trombosis aórtica con isquemia severa de miembros inferiores, ateroembolismo, trombosis venosa por compresión ilio-cava), la rotura del aneurisma constituye la complicación más

grave y frecuente dado el shock hipovolémico que ocasiona con importante riesgo de muerte. Aproximadamente se producen cada año en Estados Unidos unas 15.000 muertes por aneurisma de aorta roto, siendo la 13^a causa de muerte en varones por encima de los 55 años⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

II.A.3. Historia natural de los aneurismas de aorta abdominal

De forma general podemos resumir la evolución natural de los aneurismas de aorta abdominal en crecimiento progresivo del mismo hasta que se produce finalmente su rotura, si una enfermedad concomitante no produce el fallecimiento del paciente antes. Según una revisión de la bibliografía realizada por Hallin y colaboradores⁽⁹⁾, la velocidad media de crecimiento de los aneurismas entre 3 y 3.9 cm es de 0.33 cm/año, de 0.41 cm/año cuando los aneurismas miden entre 4 y 5 cm, y de 0.51 cm/año si son mayores de 5 cm. Diferentes factores se han relacionado con una tasa mayor de crecimiento, como el tabaquismo activo, la hipertensión arterial y la cantidad de trombo mural del aneurisma⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾.

Durante las últimas 5 décadas el principal factor determinante del riesgo de rotura de los AAA ha sido el diámetro máximo del aneurisma. Según una revisión de Brewster y colaboradores⁽¹³⁾, el riesgo de rotura de un aneurisma entre 4 y 5 cm de diámetro máximo se cifra ente 0.5 y 5% al año, subiendo hasta el 20% al año en los aneurismas entre 6 y 7 cm (Tabla 2.1). Otros factores, como la tasa de crecimiento, la forma del aneurisma y la historia familiar también influyen en el riesgo de rotura (una tasa de crecimiento rápida, los aneurismas saculares y los pacientes con historia familiar de AAA presentan un riesgo de rotura incrementado). Recientemente, el análisis de

elementos finitos permite un estudio detallado de las características biomecánicas de los aneurismas de aorta, permitiendo una predicción no sólo del riesgo de rotura de un paciente con AAA, sino del segmento aórtico con mayor estrés parietal (y por tanto, de mayor riesgo de rotura)⁽¹⁴⁾. Este método de predicción ya ha sido validado en algunos centros. Sin embargo, en espera de que estudios multicéntricos lo validen, el diámetro máximo del aneurisma continuará siendo por el momento el principal determinante del riesgo de rotura y el factor más importante a la hora de sentar la indicación quirúrgica.

Diámetro máximo del AAA (cm)	Riesgo de rotura anual (%)
<4	0
4-5	0.5-5
5-6	3-15
6-7	10-20
7-8	20-40
>8	30-50

Tabla 2.1: Riesgo de rotura anual en relación con el diámetro máximo del AAA al año expresado en porcentaje, tomado de: Brewster DC et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. J Vasc Surg. 2003; 37(5): 1106-17.

II.B. Patogenia de los AAA

En el momento actual aún no se encuentra claramente definido cuál es el mecanismo por el que la aorta abdominal se dilata formando un aneurisma. Se pueden considerar tres teorías etiopatogénicas: la arterioesclerótica, la hemodinámica-mecánica y la inmunogenética.

II.B.1. Teoría arterioesclerótica

Muchos de los pacientes con un AAA presentan algún grado de enfermedad arterioesclerótica en el territorio coronario, carotídeo y en miembros inferiores. Además, los pacientes con un AAA, presentan algunos de los factores de riesgo que habitualmente se encuentran asociados a la arterioesclerosis.

La arterioesclerosis es una patología que consiste en una compleja serie de eventos entre los que se encuentran la proliferación y migración celular, el depósito intimal de lípidos, la inflamación, la fibrosis y la necrosis que va a dar lugar como colofón a la formación de la placa arterioesclerótica. Cuando esta se forma, las arterias tienden a compensar la disminución en la luz arterial con una remodelación que lleva al crecimiento de la misma para intentar mantener su diámetro ante el crecimiento de la placa. Este hecho ha sido demostrado en las arterias coronarias, carotídeas, aorta abdominal y arterias femorales superficiales de humanos⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾. La secuencia de hechos que defienden aquellos que abogan por un origen arterioesclerótico de los AAA es la siguiente:

1. El depósito de la placa arterioesclerótica en la íntima de la aorta se acompaña de un crecimiento compensatorio de la arteria con

un adelgazamiento y atrofia de la media que se encuentra debajo de la placa. Bajo estas circunstancias, la placa es la responsable del soporte estructural de la aorta.

2. Una atrofia posterior de la placa da lugar a mayor crecimiento de la aorta ya que su pared, al tener la media atrófica y adelgazada, es incapaz de soportar la tensión. Se produce por tanto un aumento progresivo del aneurisma por fuerzas mecánicas.
3. Además, el proceso de regresión de la placa puede dar lugar a una liberación de enzimas proteolíticas que ayuden en este proceso.

II.B.2. Teoría mecánica

La aorta abdominal presenta una serie de características particulares que pueden hacerla susceptible a la aparición de AAA desde un punto de vista mecánico. Existen una serie de diferencias entre la aorta abdominal y torácica de la especie humana no presentes en otras especies de mamíferos, que apoyan esta aseveración.

Por una parte, la aorta abdominal presenta una cantidad mucho menor de vasa vasorum en su pared, lo que da lugar a un déficit de nutrientes respecto a la aorta torácica. Al mismo tiempo, la pared de la aorta torácica presenta un número de lamelas que soportan una tensión local de 2.000 dynas/cm, que es lo habitual entre otras especies de mamíferos. Sin embargo, en la aorta abdominal el número de lamelas está muy disminuido y esto hace que deban soportar una tensión local de 3000 dynas/cm, es decir, un 50% más que en la aorta torácica⁽¹⁷⁾.

La unión de este factor puramente "físico" a la disminución de nutrientes con los subsecuentes cambios metabólicos en la pared, puede dar lugar a la aparición de una debilidad local que predisponga al desarrollo de aneurismas en esta localización.

II.B.3. Teoría inmunogenética

II.B.3.1. Introducción

Frente al concepto clásico de que la arterioesclerosis es la causa fundamental de los AAA, a mediados de los 80 y durante la década de los 90 comenzaron a aparecer estudios que proponían mecanismos diferentes en la patogenia de los AAA. Estos estudios buscaban otra posible explicación diferente a la arterioesclerótica, en base a las diferencias que se encontraban entre la arterioesclerosis aórtica y los AAA y al tratar de dar una explicación al papel predominante que jugaban las metaloproteinasas en la patogenia de éstos.

II.B.3.2. Diferencias entre los AAA y la arteriosclerosis aórtica

Aunque los aneurismas inespecíficos de aorta abdominal presentan evidencias de degeneración arterioesclerótica tanto desde el punto de vista macroscópico como microscópico, el concepto clásico según el cual la arterioesclerosis es la causa fundamental de estos aneurismas se encuentra hoy en duda.

Una posible explicación para los hallazgos de arterioesclerosis en los aneurismas de aorta abdominal infrarrenal es que, a medida que el vaso se dilata, se producen alteraciones del flujo laminar en la superficie interna del

aneurisma, lo que condicionaría la proliferación subintimal. Esto daría lugar a la formación de la placa arterioesclerótica, de la misma manera que ocurre en las bifurcaciones arteriales, que es el lugar donde más frecuentemente asientan las lesiones arterioescleróticas⁽¹⁸⁾.

La asociación de estos aneurismas con los factores de riesgo habitual en los pacientes con arterioesclerosis también pueden ser explicados mediante algunas teorías:

- La hipertensión puede tener un efecto directo sobre la dilatación de un vaso que se encuentra predispuesto por su debilidad, de forma independiente al efecto de proliferación subintimal que es típico de la degeneración arterioesclerótica⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾.
- El tabaco puede tener un efecto independiente mediante la inhibición de determinados factores antiproteolíticos que protegen la matriz como la α 1- antitripsina⁽¹⁹⁾.
- Aunque los niveles de colesterol se encuentran elevados en los pacientes con aneurismas inespecíficos de aorta abdominal, siendo un factor de riesgo cuando se analizan series de pacientes largas, el 60% de los pacientes presentan niveles inferiores a 240 mg/dl y el 40% niveles inferiores a 215 mg/dl, niveles medios muy inferiores a los obtenidos en los pacientes que presentan arterioesclerosis⁽¹⁹⁾.

Por tanto estos hechos pueden explicarse con la teoría de que algunos factores de riesgo (sobre todo la hipertensión y el tabaquismo) actúan produciendo lesiones arterioescleróticas en unos pacientes y degeneración

aneurismática en otros. Además, hay otros puntos que apoyan la aseveración de que los aneurismas no son arterioescleróticos en origen:

- En comparación con los pacientes que presentan enfermedad oclusiva del sector aortoiliaco, los pacientes con aneurismas de aorta abdominal presentan una edad media superior, afectan con mayor frecuencia a hombres y presentan menos enfermedad oclusiva periférica⁽²¹⁾.
- La presencia de un aneurisma de aorta abdominal se asocia a determinadas patologías independientes de la arterioesclerosis, como por ejemplo a las hernias inguinales y al enfisema, lo cual puede indicar la presencia de determinadas condiciones patológicas sistémicas independientes de la arterioesclerosis⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾.
- La presencia de aneurismas en otras localizaciones (ilíacos, femorales, poplíteos e intracraneales) se asocia con mayor frecuencia a pacientes con aneurisma de aorta abdominal que a pacientes con arteriosclerosis obliterante⁽²²⁾.
- Estudios poblacionales indican que la incidencia de aneurismas de aorta abdominal está aumentando, mientras que la incidencia de enfermedad arterioesclerosa del sector aortoiliaco está disminuyendo⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾.

Desde el punto de vista anatomopatológico, hay diferencias claras entre ambas enfermedades, que se hacen aún más patentes cuando se realizan estudios inmunohistoquímicos. El primer estudio que puso de manifiesto estas diferencias fue realizado por Koch y colaboradores en 1990⁽²⁸⁾.

En él se mostró cómo las características anatomopatológicas de ambas enfermedades eran muy diferentes al analizar en profundidad las subpoblaciones de células inflamatorias que se encontraban presentes en cada caso. Las diferencias quedan esquematizadas en los siguientes puntos:

- Desde el punto de vista microscópico, la arterioesclerosis aórtica se caracteriza por la presencia de placas que se localizan en la íntima, con una media que se encuentra afectada por una reacción inflamatoria y con escasa o nula afectación de la adventicia. En los aneurismas de aorta abdominal se puede observar cómo la íntima está pobremente conservada y muy atrófica, la media se encuentra conservada aunque atrófica, existiendo una gran afectación de la adventicia, donde reside una intensa reacción inflamatoria. Existe asimismo una disminución marcada de células musculares lisas (CML) en la capa media.

- Cuando se analiza la reacción inflamatoria existente en ambos tipos de afectación aórtica, puede observarse cómo en los especímenes de arterioesclerosis aórtica el infiltrado inflamatorio es mucho menor que en los casos de AAA, y que además se localiza fundamentalmente en la media, frente a la adventicia en los AAA. Además, al estudiar las subpoblaciones de linfocitos, se observa cómo en la arterioesclerosis aórtica predominan la presencia de linfocitos T con un índice CD-4+/CD-8+ de 4:1, práctica ausencia de linfocitos B, que además se localizan en la adventicia, y presencia de macrófagos en mucha menor cuantía que en los AAA y que se ubican principalmente en la placa arterioesclerótica. En los

especímenes de aneurisma de aorta abdominal se encuentra un infiltrado inflamatorio mucho más intenso y que se localiza en la adventicia como ha sido anteriormente expuesto. Los linfocitos T representan un porcentaje menor del infiltrado inflamatorio en comparación con la arterioesclerosis y además presentan un índice CD-4+/CD-8+ de 7:1 (mayor cantidad de linfocitos T-helper proporcionalmente respecto a la aorta arterioesclerótica). Los linfocitos B tienen una presencia importante, constituyendo el 25-30% del infiltrado inflamatorio, y los macrófagos se encuentran distribuidos de forma similar entre media y adventicia pero en cantidad superior a la arterioesclerosis aórtica.

Todas estas diferencias pueden observarse en la Fig.2.1⁽²⁹⁾.

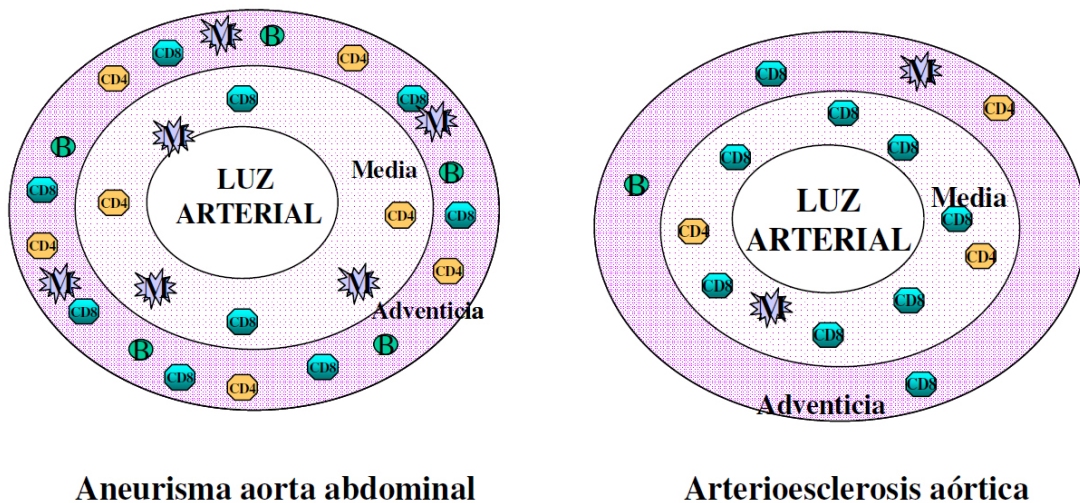


Figura 2.1: Diferencias en las poblaciones y localización de las células inmunes en la pared de la aorta afectada por arterioesclerosis y por AAA. Tomado de: Moñux Ducajú G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético[tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

II.B.3.3. Papel de las metaloproteinasas

Las metaloproteinasas, son un grupo de enzimas que juegan un papel muy importante en los procesos de remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Estudios realizados durante la última década, han demostrado su importancia en la formación de los aneurismas de aorta abdominal, actuando en la pared de los mismos alterando los patrones normales de colágeno y elastina y produciendo por tanto la debilidad de la pared. En el momento actual se consideran que tienen una importancia clave las siguientes metaloproteinasas:

- MMP-1 (Colagenasa intersticial): Produce degradación del colágeno. Se produce en las células mesenquimales ante el estímulo de determinadas citoquinas⁽³⁰⁾.
- MMP-2 (Gelatinasa A): Es un proteina de 72 Kd. Produce degradación de la elastina. Se localiza sobre todo en la media y en la adventicia, donde existen placas de ateroma. Se ha encontrado en las muestras de pacientes portadores de un AAA, sobre todo de pequeño tamaño⁽³¹⁾, pero no en aortas normales ni afectadas por enfermedad oclusiva⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾.
- MMP-3 (Estromelisinina): Se produce en los macrófagos de la media y sobre todo de la adventicia. Se piensa que juega un papel importante en la degradación de la elastina y que además podría intervenir en la activación de la MMP-1⁽³⁵⁾.
- MMP-9 (Gelatinasa B): Es una proteína de 92 Kd. Produce degradación de la elastina. Se produce principalmente en los

macrófagos de la adventicia y se piensa que es la principal de las MMP's en la patogenia de los AAA. Al igual que la gelatinasa-A, se ha encontrado en muestras de aneurismas de aorta abdominal pero nunca en muestras de aortas normales ni aortas afectadas por enfermedad oclusiva⁽³¹⁾⁽³³⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾.

- MMP-12 (Elastasa macrofágica). Implicada en la degradación de la elastina. Se produce en los macrófagos localizados en la media y en la adventicia. Se caracteriza por localizarse en el tejido aórtico únicamente en presencia de aneurisma (al igual que ocurre con las dos gelatinasas⁽³³⁾).

II.B.4. AAA y susceptibilidad genética

El mejor conocimiento del genoma humano está facilitando el conocimiento de los genes que median en el desarrollo de los AAA. Se estima que el 19% de los familiares de primer grado de enfermos afectados de AAA presentan una predisposición genética a desarrollar la enfermedad⁽³⁷⁾.

Se han descrito alteraciones genéticas asociadas a muchos otros genes candidatos a estar implicados en la génesis de los AAA. Probablemente los más estudiados son los relacionados con procesos inflamatorios, como el gen de la interleuquina (IL)-10, IL-15, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF) y factor de crecimiento beta (TGF), mediadores de la respuesta inmune como el antígeno leucocitario humano (HLA-DR), proteasas tisulares como la metaloproteasa (MMP)-9, MMP3, inhibidores de las MMP (TIMP)-1 y TIMP-2, y aquellos que codifican para diferentes componentes del sistema renina-angiotensina como la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y el receptor

tipo 1 de angiotensinall, entre otros⁽³⁸⁾. Un hallazgo repetido en la literatura científica es que existen ciertos polimorfismos (alteraciones en la secuencia de un gen que ocurre en más del 1% de la población) que se asocian al desarrollo de AAA. Diversos estudios han descrito la asociación del polimorfismo del gen que codifica IL-10 (IL-10 -1082A), con el desarrollo de AAA⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾. Otros estudios han demostrado una mayor incidencia del alelo HLA-DR B1*0401 en pacientes con AAA. Por el contrario, el alelo HLA-DR B1*01 se presenta como un factor protector ante el desarrollo de AAA, siendo la asociación entre ambos alelos similar a la observada en enfermedades autoinmunes⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾.

Sin embargo, los resultados que se han obtenido hasta el momento son, en muchas ocasiones, inconsistentes y dispares, no mostrando evidencias claras de asociación con la enfermedad. Esto puede deberse al reducido tamaño muestral, diversidad en las poblaciones analizadas y tipo de técnicas empleadas en los estudios. Por ello, en los últimos años han ido surgiendo estudios genéticos a gran escala denominados «estudios de asociación integral del genoma» (genome-wide association [GWA]), para intentar identificar en grandes grupos poblacionales genes candidatos de asociación con el desarrollo de AAA.

Los GWA se están centrando fundamentalmente en el análisis de regiones intergénicas de determinados cromosomas. Hasta ahora se han centrado en los cromosomas 3, 4, 6, 11 y 19 en busca de posibles asociaciones con la aparición de aneurismas⁽⁴³⁾. El primero de estos estudios genéticos a gran escala fue el realizado por Elmore et al., en el que identificaron una posible asociación de un haplotipo en la región 3p12.3 del cromosoma 3 con el desarrollo de AAA⁽⁴⁴⁾. Sin embargo, el impacto tanto de

este estudio como del de los realizados con los cromosomas 4, 6, 11 y 19 ha sido limitado debido al reducido número de pacientes analizados en cada uno de ellos. Ha sido recientemente cuando se ha confirmado la asociación de una variación genética en la región 9p21 del cromosoma 9 con la aparición y desarrollo de AAA⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾. Es por ello, junto con la del gen de la fibrilina, la segunda variante encontrada hasta la fecha con consistencia de asociación genética con el desarrollo de AAA. Esta misma variante también se ha asociado con riesgo de enfermedad aterosclerótica, independientemente de los factores tradicionales⁽⁴⁷⁾. Se trata de una nueva alteración o polimorfismo en los genes CDKN2A, DKN2B y ARF que codifican proteínas con un papel fundamental en procesos como proliferación celular, envejecimiento celular y apoptosis. Sin embargo, el mecanismo por el que las variantes en esta región del cromosoma 9 aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular o de AAA sigue siendo desconocido.

II.B.5. Teoría actual sobre la patogenia de los AAA

Junto al importante papel que juegan las metaloproteinasas en el desarrollo de los aneurismas de aorta abdominal y el infiltrado inflamatorio presente en la pared de estos aneurismas, existe otro punto importante que es el nexo de unión entre estos dos hechos. La presencia de un nivel aumentado de determinadas citocinas como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) pueden influir en la producción alterada de metaloproteinasas que lleven a la destrucción de los componentes de la pared aórtica⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾. Existen además hallazgos recientes en los que se pone de manifiesto que la respuesta inmune celular también puede formar parte en la modulación de la patogénesis de los AAA. Como ya se ha comentado, los linfocitos CD4+ (helper) son prevalentes

en los AAA, y las citocinas tipo Th-1 o pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α), que aumentan la expresión en macrófagos de proteinasas que degradan la matriz, se encuentran en mayor cantidad en los aneurismas de aorta abdominal⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾. Sin embargo, también se ha observado que las citocinas Th-2 o anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) también están aumentadas, sugiriendo que existen mecanismos reguladores celulares endógenos capaces de suprimir la destrucción celular⁽⁵⁰⁾. Otros trabajos realizados en modelos animales indican que en la fase temprana de la formación del aneurisma existiría una respuesta inflamatoria tipo Th-1; sin embargo, en fases posteriores se produce un incremento en la producción de citocinas Th-2 que actuarían suprimiendo la inflamación⁽⁵¹⁾.

En pacientes con AAA, el modo y amplitud de esta respuesta inmune celular podría jugar un papel importante en la variabilidad observada tanto en la velocidad como en la extensión de la progresión del aneurisma, tanto entre distintos individuos como dentro de un mismo individuo en distintos momentos. Por tanto, con todo lo anterior, se podría realizar un esquema que intentara resumir el proceso de aparición de los aneurismas de aorta abdominal

El porqué se produce esta reacción inflamatoria que va a desencadenar el proceso es todavía una incógnita a resolver. Entre las opciones que se deben tener en cuenta se encuentra la de una susceptibilidad genética, que puede ponerse de manifiesto en forma de una enfermedad autoinmune.

II.C. Tomografía por emisión de positrones (PET) y aneurisma de aorta infrarrenal

II.C.1. Biomarcadores para el aneurisma de aorta infrarrenal

En la evolución de los AAA el crecimiento inicial suele ser lento y progresivo, pero en determinado momento de su curso natural puede acelerarse y llegar a la rotura. Hasta el momento el diámetro del aneurisma es el factor más determinante para valorar el riesgo de rotura, por lo que habitualmente en los AAA de pequeño tamaño el manejo suele ser conservador, aunque se ha demostrado que AAA de menos de 5 cm. de diámetro pueden llegar a la fatal complicación. Las guías actuales recomiendan cirugía electiva para pacientes con AAA con diámetro mayor de 5,5 cm de diámetro, aunque determinados grupos de riesgo (mujeres, fumadores, hipertensos o broncópatas) pueden beneficiarse de una intervención con diámetro de 5 cm⁽⁵²⁾. El diagnóstico y seguimiento de los AAA se realiza habitualmente con ecografía abdominal, angioTC o angioRMN (Fig 2.2).

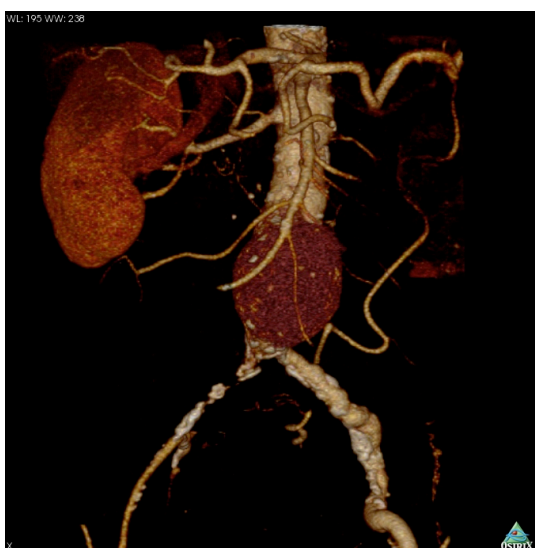


Figura 2.2. AngioCT con reconstrucción en 3 D mostrando un aneurisma de aorta infrarrenal

A pesar de la probada eficacia de estas técnicas de imagen, los costes asociados pueden ser elevados⁽⁵³⁾. Por ello se han estudiado otros métodos alternativos para valorar tanto la velocidad de crecimiento como el riesgo de rotura de los mismos. Los biomarcadores han acaparado una gran atención en el campo de la investigación sobre los aneurismas, y se pueden definir como aquellas moléculas cuantificables (péptidos, proteínas y productos metabólicos) que expresan un proceso biológico específico en el organismo en un tiempo determinado⁽⁵⁴⁾. Para que un biomarcador sea útil, debería ser capaz de detectar la enfermedad en sí o expresar su progresión. Por tanto, un biomarcador eficaz debería detectar la presencia de un aneurisma subclínico o ser una medida de su tamaño y tasa de expansión, que pudiera predecir el riesgo de rotura. Es bien conocido que este riesgo aumenta cuando la tasa de expansión es mayor que la esperada. Por tanto, un biomarcador podría definir el intervalo óptimo de seguimiento y posiblemente identificar algunos patrones etiopatogénicos que podrían orientar hacia el mejor momento de tratamiento del AAA.⁽⁵⁵⁾

Algunos biomarcadores relacionados con el AAA son conocidos desde hace varios años. Las metaloproteinasas son un grupo de enzimas que juegan un papel muy importante en los procesos de remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Estudios realizados durante la última década, han demostrado su importancia en la formación de los aneurismas de aorta abdominal, actuando en la pared de los mismos alterando los patrones normales de colágeno y elastina y produciendo por tanto la debilidad de la pared. De entre todas las metaloproteinasas, parece que la MMP-2 y la MMP-9 son las más importantes en la patogenia de esta enfermedad. Además cobra

un papel importante no sólo el nivel de metaloproteasas, sino además el estado en el que se encuentra el equilibrio entre estas enzimas, y sus inhibidores naturales, los TIMP. Parece que el desbalance entre todas estas moléculas da lugar al estado proteolítico característico de los AAA.⁽³³⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾ Junto al importante papel que juegan las metaloproteinasas en el desarrollo de los aneurismas de aorta abdominal y el infiltrado inflamatorio presente en la pared de estos aneurismas, existe otro punto importante que es el nexo de unión entre estos dos hechos. La presencia de un nivel aumentado de determinadas citocinas como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral pueden influir en la producción alterada de metaloproteinasas que lleven a la destrucción de los componentes de la pared aórtica⁽⁴⁸⁾.

La inflamación desempeña un papel fundamental en la aparición y en la posterior expansión de los AAA⁽⁵⁶⁾. La captación de 18- Fluorodeoxiglucosa (18F-FDG) mediante la tomografía por emisión de positrones (PET) se utiliza de forma habitual para detectar la actividad hipermetabólica celular en tumores y procesos inflamatorios e infecciosos. Un reciente trabajo de Paraskevas remarca la posible utilidad del PET en detectar una mayor actividad inflamatoria, inestabilidad de la pared aórtica, y riesgo de rotura, así como un predictor indirecto de crecimiento del saco aneurismático en pacientes tratados del AAA mediante reparación endovascular (EVAR), en presencia de endofugas, sean o no éstas detectadas mediante pruebas de imagen⁽⁵⁷⁾.

II.C.2. Tomografía por emisión de positrones (PET) y 18-FDG

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una poderosa técnica de imagen molecular disponible tanto para uso clínico como experimental.

Como cualquier otra técnica de Medicina Nuclear, se basa en la detección de fotones emitidos por el paciente tras la administración de un trazador radiomarcado. Las características físicas del PET suponen una mayor ventaja del mismo frente a la gammagrafía monofotónica, fundamentalmente porque los trazadores se marcan con radionúclidos emisores de positrones. Los dos fotones resultantes de la desintegración del positrón son emitidos en direcciones opuestas (a 180° uno del otro). Por un lado, se incrementa el número de fotones que son detectados y se mejora la resolución espacial, con mayor probabilidad para detectar una lesión. Por otro lado, las imágenes se pueden corregir completamente, particularmente la atenuación, lo que permite una mayor precisión y una cuantificación reproducible de la distribución del trazador⁽⁵⁸⁾. Dependiendo del radiotrazador, se pueden estudiar a nivel molecular una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Sin embargo, en la práctica clínica habitual, la mayoría de los estudios mediante PET se realizan utilizando el 18F-FDG, que refleja la captación de glucosa y el metabolismo resultante de la actividad celular.

El FDG es un análogo de la glucosa, que se transporta hacia las células por transportadores de glucosa (GLUTs). Una vez dentro de las células, el FDG es fosforilado a FDG-6-fosfato, que no es un sustrato para las enzimas de la cadena glicolítica, por lo que se acumula en las células. El PET mediante 18-FDG reconoce el aumento de la actividad metabólica y fundamentalmente es empleado para la detección de neoplasias. De hecho, el metabolismo celular de la glucosa está significativamente elevado en la mayoría de los tipos de cáncer, debido al aumento de la expresión de los transportadores de membrana y al aumento de la actividad de la hexoquinasa⁽⁵⁹⁾. Sin embargo, la

captación de 18-FDG no es específica de los tumores. Puede observarse una captación elevada en muchas situaciones fisiológicas y patológicas no neoplásicas⁽⁶⁰⁾. Habitualmente el nivel de captación de FDG por las células inflamatorias en estado de reposo es baja en comparación con las células tumorales. Sin embargo, cuando se activan, estas células pueden presentar un significativo incremento en la captación de glucosa y su metabolismo. Esto ha sido evaluado en diversos escenarios experimentales, incluyendo trasplante de piel, inflamación inducida por turpentina, y tras la activación de linfocitos T en abscesos bacterianos o de linfocitos B tras infección vírica. La falta de especificidad con respecto a los tumores hace que el PET sea una poderosa herramienta para evaluar enfermedades inflamatorias e infecciosas, así como para monitorizar infecciones de prótesis vasculares⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾.

II.C.3. PET-TC y enfermedad arterial

Sin embargo la captación de 18-FDG se ve frecuentemente en la pared arterial en ausencia de enfermedad inflamatoria vascular conocida. En un estudio que evaluó dos series de pacientes a los que se les realizó un PET por enfermedad oncológica u otra indicación, se demostró que la tasa de captación positiva en grandes vasos era cercana al 50%, y que se incrementaba con la edad⁽⁶⁴⁾. También se demostró que la hipercolesterolemia y la edad, entre los principales factores de riesgo para aterosclerosis, eran los únicos parámetros correlacionados con la presencia de dicha captación⁽⁶⁵⁾.

Con la utilización posterior del PET-TC (combinación del PET con la tomografía axial computerizada), el procedimiento se acorta y simplifica. Habitualmente, el paciente está en ayunas desde 6 horas antes de inyectar el

18-FDG. Esto es importante para valorar procesos inflamatorios, ya que en ellos la ingestión de glucosa puede reducir significativamente la expresión de los transportadores de glucosa, así como la captación de 18-FDG⁽⁶⁶⁾. Los actuales *scanners* híbridos se acompañan de un TC para una corrección de la atenuación y un mapa anatómico. La corrección de la atenuación se realiza con los datos de un TC continuo, a baja dosis, desde la base del cráneo hasta los muslos. La utilización de contraste intravenoso tiene escaso efecto sobre la corrección de la atenuación y la cuantificación de la captación, pero aporta información adicional acerca de los vasos, posible trombo y tejidos circundantes⁽⁶⁷⁾. Diversos trabajos demostraron la elevada captación de FDG en la placa de ateroma inestable, así como la correlación con cifras elevadas de MMP-1 circulante. Esto sugiere que el PET-TC podría tener una utilidad clínica en la monitorización de la placa de ateroma⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾. Posteriores estudios consiguieron evidenciar una mayor captación del radiotrazador en las zonas de la placa que presentaban una mayor densidad de macrófagos⁽⁷¹⁾. De hecho, esa mayor captación se ha demostrado también en diversas enfermedades inflamatorias de los grandes vasos, tales como la arteritis de células gigantes y la de Takayasu⁽⁶⁵⁾, e incluso en placas de ateroma inestables de grandes vasos⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾.

En 2002 Sakalihan observó la correlación entre la captación de 18-FDG en la pared aneurismática y una rápida expansión del aneurisma en algunos pacientes⁽⁷²⁾. En posteriores estudios se demostró que la captación de 18-FDG de la pared aneurismática reflejaba un incremento de la actividad metabólica, probablemente asociada a una elevada densidad de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, etc) en la adventicia⁽⁷³⁾, comprobándose

posteriormente también que esta correlación era mayor en pacientes con AAA sintomáticos⁽⁷⁴⁾, sugiriendo que este incremento de actividad metabólica podría conllevar una expansión del AAA y su posterior rotura. A pesar de que recientes trabajos ponen en duda esta teoría⁽⁷⁵⁾, no encontrando diferencias en la captación de 18-FDG entre pared de aorta aneurismática y sana ni correlación de captación con el diámetro de la aorta, otros como el de Courtois consiguen demostrar que la captación de 18-FDG en la pared de los AAA se asocia con un proceso inflamatorio caracterizado por un infiltrado de leucocitos proliferativos en la adventicia, junto con un elevación de la proteína C circulante. Además, existe una disminución de células musculares lisas en la media y determinadas alteraciones en la expresión genética involucrada en la remodelación de la adventicia y en la degradación del colágeno que potencialmente participan en la debilidad de la pared aneurismática que precede a la rotura (Fig 2.3)⁽⁷⁶⁾.

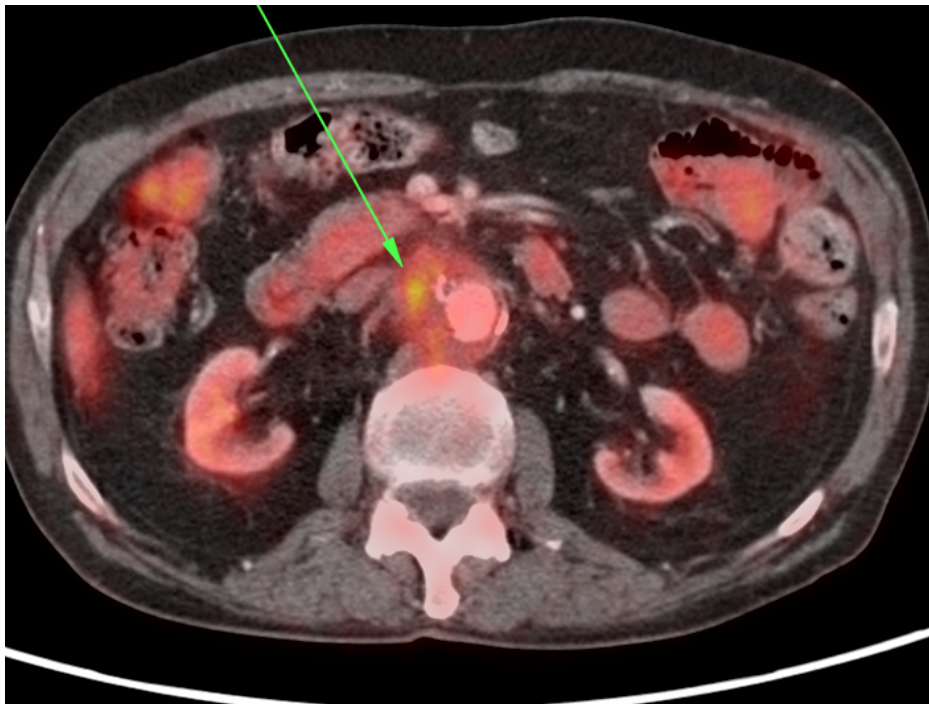


Figura2.3. Hipercaptación de 18-FDG captado mediante PET-TC en pared aneurismática

Sin embargo, dentro del metabolismo energético celular, que engloba diferentes procesos, se desconocen cuáles son los factores implicados en esa mayor actividad del metabolismo de la la glucosa en la pared aneurismática, que es detectada por una mayor captación del 18-FDG mediante el PET-TC, y que conlleva un proceso inflamatorio en dicha pared y un potencial crecimiento del AAA. Por tanto, desarrollaremos más ampliamente dicho metabolismo energético y los factores implicados en el mismo

II.D. Metabolismo celular de los hidratos de carbono

El metabolismo energético está constituido por un conjunto de reacciones bioquímicas y procesos fisicoquímicos que ocurren en la célula.

II.D.1. Glucolisis

Entre estos complejos procesos interrelacionados, la glucolisis constituye la principal fuente de energía celular a través de la oxidación de la glucosa en el citosol (Fig. 2.4). Esta ruta universal consta de diez reacciones agrupadas en dos fases:

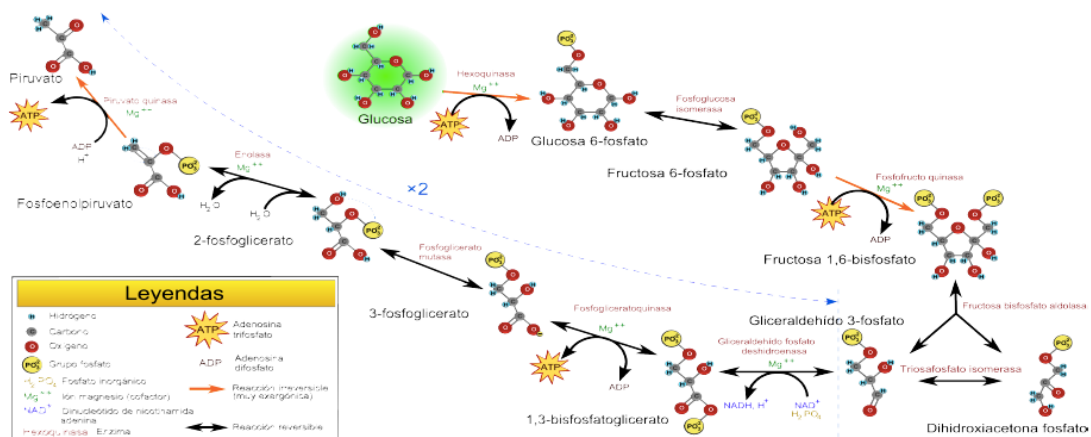


Figura2.4. Esquema de las diez reacciones que constituyen la vía glucolítica, con los sustratos, productos y enzimas catalizadoras. Fuente: www.wikipedia.es.

Una primera fase de gasto o aporte energético que comienza con la fosforilación de la glucosa y acaba con la Isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato. La segunda fase o de obtención de energía se producen 6 reacciones que acaban con la cesión de un grupo fosfato al ADP.

La última reacción de la glucólisis es catalizada por la piruvato quinasa y da lugar al piruvato por la cesión de un grupo fosfato del PEP al ADP. El anión piruvato es un compuesto orgánico clave en el metabolismo energético y puede seguir dos caminos: 1, si hay suficiente suministro de oxígeno, el ácido pirúvico es descarboxilado en la matriz de la mitocondria por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa rindiendo CO₂ y acetil coenzima A, que se introduce en el inicio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa; 2, si no hay suficiente cantidad de oxígeno disponible, el piruvato sigue una ruta anaeróbica, la fermentación, que culmina en la producción de ácido láctico.

II.D.2. Ciclo de Krebs

En las células aerobias distintas vías catabólicas convergen en el ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs (de los ácidos tricarboxílicos o del ácido cítrico) es una vía metabólica presente en todas las células aerobias, es decir, las que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones en la respiración celular. En los organismos aerobios las rutas metabólicas responsables de la degradación de los glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos convergen en el ciclo de Krebs, que a su vez aporta poder reductor a la cadena respiratoria y libera CO₂. El catabolismo oxidativo de glúcidos, ácidos grasos y aminoácidos puede dividirse en tres etapas, de las cuales el ciclo de Krebs es la segunda.

En la primera etapa, que incluye a las vías catabólicas de ácidos grasos y a la glucólisis se genera acetil-CoA (2C). Los aminoácidos pueden dar indirectamente acetil CoA , o directamente intermediarios del ciclo de Krebs. En la tercera etapa el poder reductor aportado por el ciclo de Krebs es drenado hasta el oxígeno a través de los transportadores de cadena respiratoria (NADH.H, FADH₂, CoQ y citocromos) y parte de la energía liberada se emplea en la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa.

El ciclo de Krebs es una ruta anfibólica: participa en procesos catabólicos y anabólicos. El ciclo proporciona α -cetoglutarato y oxalacetato para la síntesis de glutamato y aspartato respectivamente, entre otras moléculas fundamentales para la célula. (Fig 2.5.)

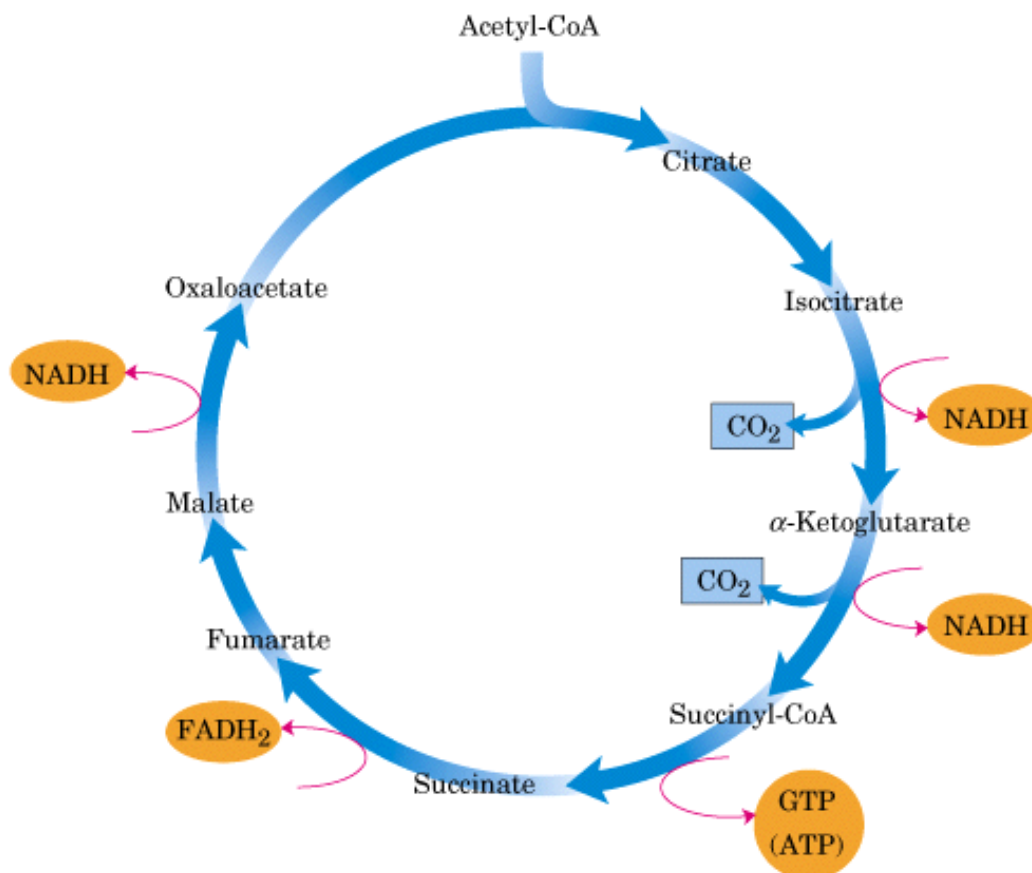


Figura2.5. Resumen del ciclo de Krebs. Cortesía M. Delgado.

La acetil-CoA generada por los diferentes catabolismos se condensa con el oxalacetato y genera citrato. A través de 7 reacciones de oxidación y descarboxilación sucesivas se regenera oxalacetato, capaz de iniciar un nuevo ciclo.

Dada la naturaleza cíclica de la vía, las reacciones en su conjunto conducen a la regeneración del oxalacetato. La malato deshidrogenasa cataliza la oxidación del malato a oxalacetato, con la reducción de un NAD: se forman 3 ATP en la cadena respiratoria. (Fig 2.6). La regulación del ciclo hace posible la producción de moléculas de acuerdo a las necesidades celulares, y asegura que no ocurra sobre o sub producción en un momento dado. La regulación del ciclo se da en diferentes puntos, porque puede alimentarse o ser abastecido a través de cualquiera de sus intermediarios. La regulación es compleja en comparación con la de vías catabólicas como la glucólisis, y se considerarán situaciones de regulación relacionadas al estado energético celular. La regulación de las enzimas es por modulación alostérica, por modificación covalente y por acumulación de productos. La "lógica" de la regulación se rige principalmente por la relación ATP/ADP y NADH.H/NAD, así como por las concentraciones de algunos intermediarios del ciclo. Las relaciones entre ATP/ADP y NADH.H/NAD están relacionadas entre sí a través de la fosforilación oxidativa que ocurre en la cadena respiratoria y ambas son señales del estado energético de la célula

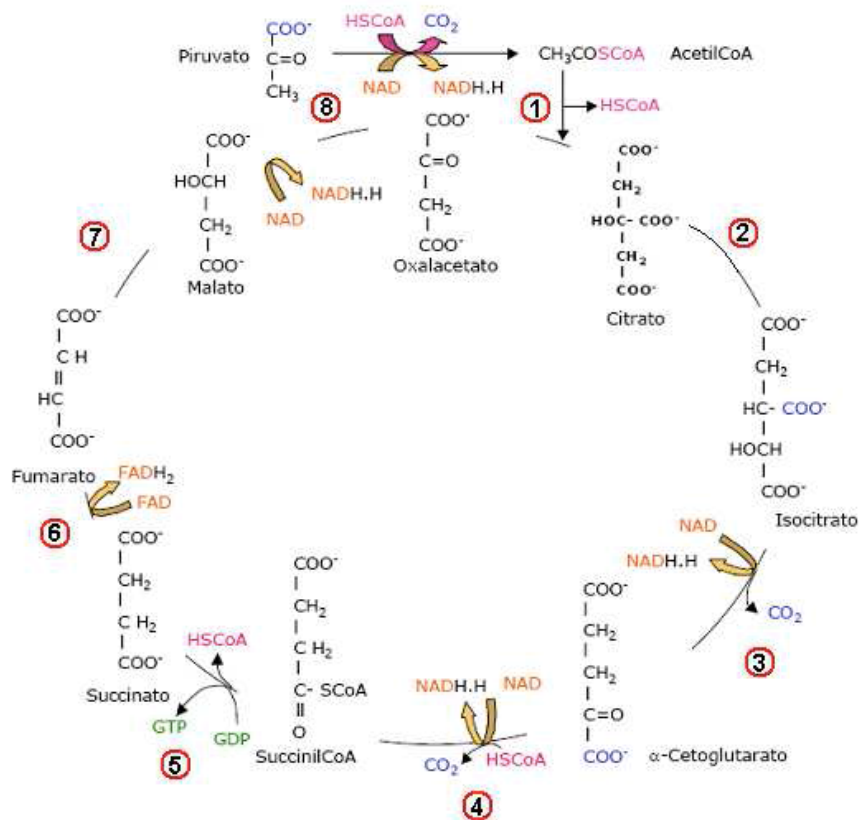
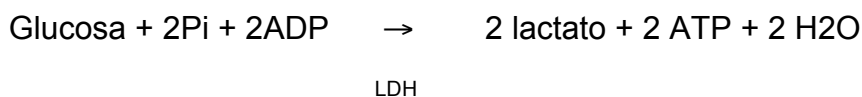


Figura2.6 Resumen reacciones Ciclo de Krebs

II.D.3 Vía anaerobia. Formación de Lactato

Cuando la cantidad de oxígeno disponible para la célula es limitada, como ocurre en el músculo durante la actividad intensa, el NADH generado durante la glucólisis no puede reoxidarse a tasas comparables en las mitocondrias y con la finalidad de mantener la homeostasis, el piruvato es entonces reducido por el NADH para formar lactato, reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa. Esta desviación metabólica del piruvato mantiene a la glucólisis operativa bajo condiciones anaeróbicas. La reacción global de la conversión de glucosa a lactato es:



II.D.4. Fosforilación oxidativa. ATP sintasa. Proteínas desacopladoras

En el proceso metabólico de obtención de energía mediante la fosforilación oxidativa adquiere gran importancia el complejo ATP sintasa, situado en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias. Su función fundamental es la de sintetizar ATP a partir del ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un flujo de protones (H^+). Esta enzima está formada por dos principales complejos, el F₀ y el F₁ (factores de acoplamiento). La ATP sintasa se puede imaginar como un motor molecular que produce una gran cantidad de ATP cuando los protones fluyen a través de ella. La tasa de síntesis es grande, el organismo humano en fase de reposo puede formar unas 10^{12} moléculas de ATP por segundo⁽⁷⁷⁾.

Las **coenzimas** reducidas procedentes del **ciclo de Krebs** (NADH, H^+ y FADH) atraviesan una serie de complejos enzimáticos (**cadena de transporte de electrones**) que producen en ellas sucesivas reacciones de **oxidación-reducción** cuyo objetivo es la utilización del flujo de **electrones** para bombear **protones** al espacio intermembrana de la mitocondria, creando un **gradiente electroquímico**, un gradiente de pH (gradiente de concentración) y un desequilibrio de carga (gradiente electroquímico) en la membrana mitocondrial interna. Las ATP sintasa forman ATP utilizando la energía libre procedente del gradiente de protones, utilizando el hecho de que los protones tienden a volver al interior del **orgánulo**, y sólo pueden hacerlo a través de la ATP sintasa, ya que la membrana interna es impermeable a los protones. Cuando los protones son bombeados fuera de la matriz, el espacio intermembrana se convierte en más ácido y con mayor carga positiva que en la matriz. La matriz es básica y con una carga negativa. **Se ha utilizado** el término “**quimiosmótico**” para describir las reacciones enzimáticas en

las que intervienen, simultáneamente, una **reacción química** y un proceso de transporte.

El **gradiente electroquímico** acopla el ritmo de la cadena de transporte electrónico con el ritmo de la síntesis de ATP. Debido a que el flujo electrónico necesita el bombeo de protones, el flujo electrónico no puede producirse más rápidamente que la utilización de los protones para síntesis de ATP (**fosforilación oxidativa** acoplada), significando en una relación estrechamente acoplada entre la **oxidación** y la **fosforilación**. Esto lleva a que los sustratos se oxidan, los electrones se transportan y el oxígeno se consume tan solo cuando se requiere la síntesis de ATP. Por lo tanto, las mitocondrias en reposo consumen oxígeno a una velocidad lenta, pero que puede incrementarse enormemente en presencia de ADP. Las mitocondrias captan el ADP, lo que estimula la ATP sintasa que disminuye el gradiente de protones. Entonces aumenta la respiración, puesto que se estimulan las bombas de protones para restablecer el gradiente. Por tanto se puede resumir diciendo que el “control respiratorio” es la dependencia de captación de oxígeno por las mitocondrias según la disponibilidad de ATP⁽⁷⁸⁾.

El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa hace desaparecer el gradiente de protones sin intervención de la ATP sintasa. De este modo se prosigue el transporte de electrones a ritmo rápido, el sistema hace un intento inefectivo de restaurar el gradiente de protones oxidando más combustible y bombeando más protones hacia el exterior de las mitocondrias. La energía producida por el transporte de electrones se descarga en forma de calor en vez de utilizarse para la síntesis de ATP. Se trata de un fenómeno donde los protones retornan a la matriz sin pasar por la ATP sintasa, lo que implica la no generación de ATP. El desacoplamiento es provocado por compuestos

químicos, conocidos como desacoplantes o como ionóforos protónicos. Los desacoplantes suelen ser compuestos hidrófobicos (bases o ácidos débiles), que captan protones rápidamente en el espacio intermembrana. Su liposolubilidad les permite difundir a través de la membrana mitocondrial interna transportando los protones y liberándolos en el lado de la matriz. La entrada rápida de protones disipa el gradiente de potencial electroquímico; por tanto la ATP sintasa es incapaz de sintetizar ATP, lo cual provoca que la membrana interna pierda su integridad estructural y, por extensión, las mitocondrias también. En este caso se dice que son porosas.

Las proteínas desacoplantes (UCP) se encuentran en la membrana mitocondrial del interior de los mamíferos. Estas proteínas permiten que los protones reingresen en la matriz mitocondrial sin que se capture energía en forma de ATP⁽⁷⁹⁾. La primera de estas UCP (*uncoupling proteins*) que se descubrió fue la proteína de desacoplamiento 1 (UCP-1), llamada también **termogenina** y que se encuentra de modo exclusivo en el **tejido adiposo pardo**. El **tejido adiposo pardo** es abundante en el recién nacido y en algunos mamíferos adultos. Además, al parecer su color marrón se debe a su elevado contenido en mitocondrias. La UCP-1 se encarga de activar la oxidación de los **ácidos grasos** y la producción de calor en el **tejido adiposo pardo**, proporcionando calor corporal durante el estrés por frío en los animales jóvenes y algunos adultos así como durante la **hibernación**. Ello se consigue desacoplando el gradiente de protones y generando así calor (termogénesis) en lugar de ATP (Fig 2.7). El **genoma humano** expresa otras cuatro proteínas desacoplantes: UCP-2, UCP-3, UCP-4 y UCP-5. El UCP-1 es exclusiva del **tejido adiposo pardo**, UCP-2 se expresa de modo ubicuo, UCP-3 se expresa

principalmente en el **músculo esquelético** , y el UCP-4 y UCP-5 se expresa en el cerebro. Estas proteínas podrían tener gran importancia para conocer mejor trastornos y enfermedades como la **diabetes** , la **obesidad** , el **cáncer** , las enfermedades del **tiroides** y el envejecimiento. No obstante el mecanismo real aún se desconoce. Asimismo, el sistema de las UCP también puede ser importante en la regulación del **potencial de membrana**⁽⁷⁸⁾ .

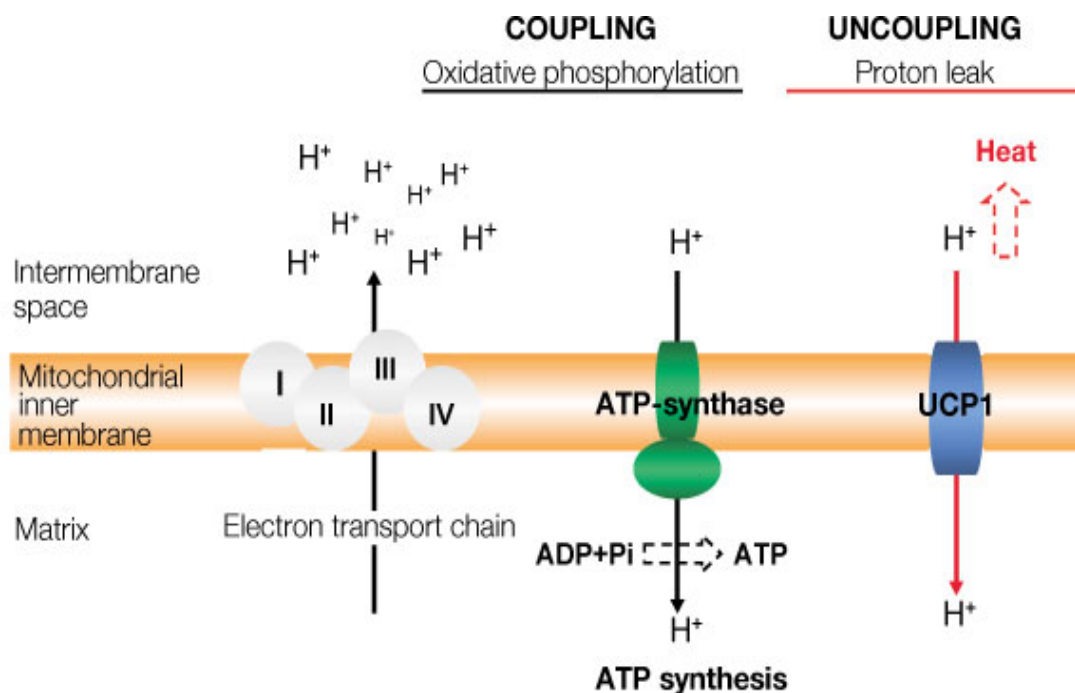


Figura 2.7. Localización y función de la UCP-1 en la cadena respiratoria mitocondrial. Los números I-IV corresponden a los complejos de dicha cadena. La ATP sintasa es el quinto complejo. Durante el proceso, los protones son bombeados a través de estos complejos, y se genera un gradiente de protones, que conlleva una síntesis de ATP por el complejo ATP sintasa. El UCP-1 cataliza un reentrada de protones en la matriz, desacoplando la cadena, reduciendo la síntesis de ATP y generando calor

II.D.5. Beta oxidación de ácidos grasos. Proteínas transportadoras

La beta oxidación (β -oxidación) es un proceso **catabólico** de los **ácidos grasos** en el cual sufren remoción, mediante la **oxidación** , de un par de átomos de carbono sucesivamente en cada ciclo del proceso, hasta que el **ácido graso** se descompone por completo en forma de moléculas **acetil-CoA** ,

que serán posteriormente oxidados en la mitocondria para generar energía química en forma de ATP. La β -oxidación de ácidos grasos consta de cuatro reacciones recurrentes. El resultado de dichas reacciones son unidades de dos carbonos en forma de acetil-CoA, molécula que pueden ingresar en el ciclo de Krebs, y coenzimas reducidos (NADH y FADH) que pueden ingresar en la cadena respiratoria. No obstante, antes de que produzca la oxidación, los ácidos grasos deben activarse con acil-coenzima A y atravesar la membrana mitocondrial interna, que es impermeable a ellos.

La activación de los ácidos grasos a acil-coenzima A (Acil-CoA), tiene lugar en el retículo endoplasmático o en la membrana mitocondrial externa, donde se halla la acil-CoA sintetasa⁽⁸⁰⁾. El ácido graso se une al coenzima A, reacción que consume dos enlaces de alta energía del ATP. Posteriormente debe usarse un transportador, la carnitina, para traslocar las moléculas de acil-CoA al interior de la matriz mitocondrial, ya que la membrana mitocondrial interna es impermeable a los acil-CoA. La carnitina se encarga de llevar los grupos acilo al interior de la matriz mitocondrial, en cuyo proceso tienen especial relevancia las enzimas carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI), la carnitina palmitoiltransferasa II (CPTII) y la translocasa, la primera en la membrana mitocondrial externa y las dos últimas en la membrana mitocondrial interna (Fig 2.8). Finalmente, se producen las cuatro reacciones que conducen a la liberación de una molécula de acetil CoA y al acortamiento en dos átomos de carbono del ácido graso:

- El primer paso es la oxidación del ácido graso activado(acil-CoA graso) por FAD, favorecida por la enzima acil-CoA deshidrogenasa, una flavoproteína que tiene el coenzima FAD unido covalentemente.

- El segundo paso es la **hidratación**, o adición de una molécula de agua.
- El tercer paso es la **oxidación** por el **NAD** , catalizada por la **L-3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa** .
- El cuarto y último paso es la **tiólisis** y da lugar a una molécula de **acetil CoA** y un acil CoA con dos carbonos menos. Estas cuatro reacciones continúan hasta que la escisión completa de la molécula en unidades de acetil CoA. Por cada ciclo, se forma una molécula de **FADH** , una de **NADH** y una de acetil CoA.

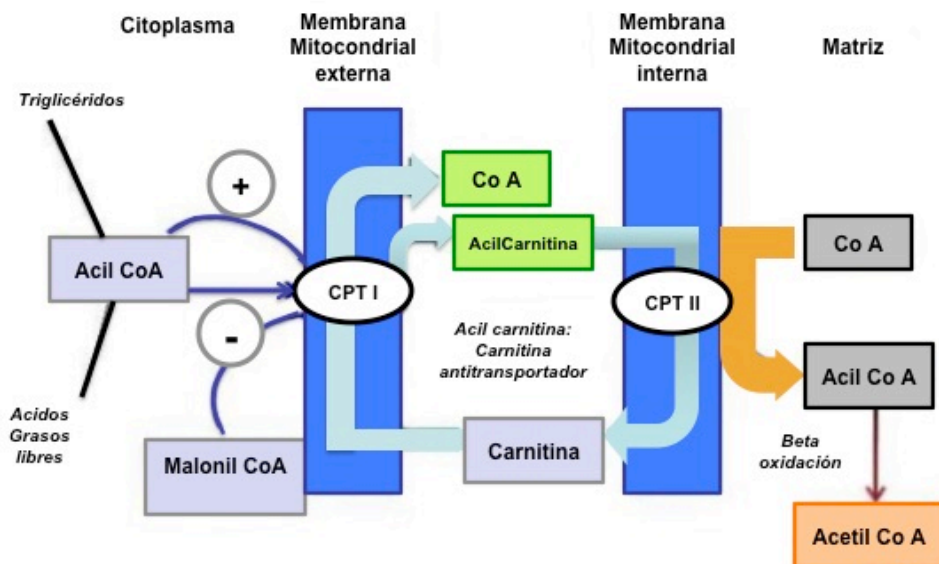


Figura 2.8. Catabolismo de los ácidos grasos

En la Fig.2.9 se resumen los diferentes procesos implicados en el metabolismo energético celular:

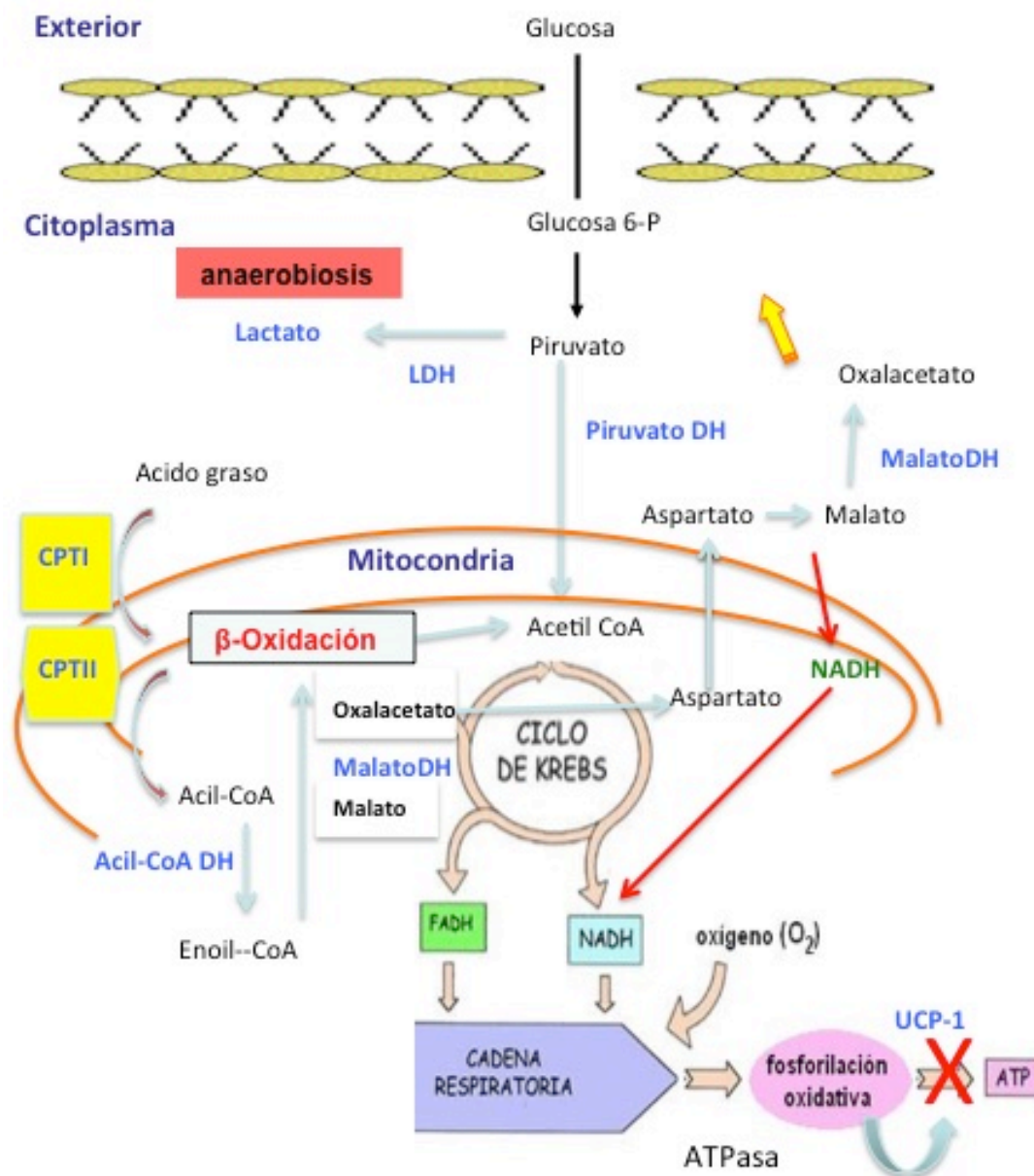


Figura 2.9. Esquema representativo del metabolismo energético celular con los procesos implicados: metabolismo anaerobio, aerobio, β-oxidación y fosforilación oxidativa

II.E. Proteómica

La proteómica es una técnica que permite el estudio a gran escala de las proteínas de una muestra, constituyendo uno de los más útiles y potentes métodos de separación de proteínas que existe actualmente. El término proteómica fue introducido por Marc R. Wilkins para hacer referencia al conjunto de proteínas identificadas mediante 2-DE en una muestra biológica compleja en un momento determinado⁽⁸¹⁾. La tecnología utilizada para la separación de las proteínas es relativamente reciente: en la década de los 70 la electroforesis en dos dimensiones se utilizaba como una potente herramienta para la separación y cuantificación de proteínas⁽⁸²⁾. Su alta resolución, su sensibilidad y reproducibilidad hicieron a esta técnica cada vez más popular en la década de los 80, principalmente tras la aparición de las membranas PVDF (del inglés *polyvinylidene difluoride*)⁽⁸³⁾ y la creación de la primera base de datos para geles bidimensionales. Posteriormente, con la aparición y mejora de diversos métodos de preparación y extracción de proteínas de la muestra, así como de las distintas herramientas de secuenciación (método de secuenciación EDMAN⁽⁸⁴⁾), comenzó a tener una mayor importancia como método de análisis de las proteínas presentes en los distintos tipos de muestras.

El proteoma de un organismo es el conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional. El proteoma es altamente dinámico, varía acorde al tipo de célula y su estado funcional y puede reflejar cambios inmediatos y característicos en respuesta a determinadas enfermedades o estímulos externos. Este conjunto de proteínas presentes en un fluido corporal, un tejido o un organismo en realidad es un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en un momento dado, por lo que el proteoma no puede

predecirse directamente a partir de la información estática del genoma. Una proteína puede existir en múltiples formas según modificaciones postraduccionales o procesos de degradación que modifican la estructura de la misma, su localización, función y recambio (Fig. 2.10).

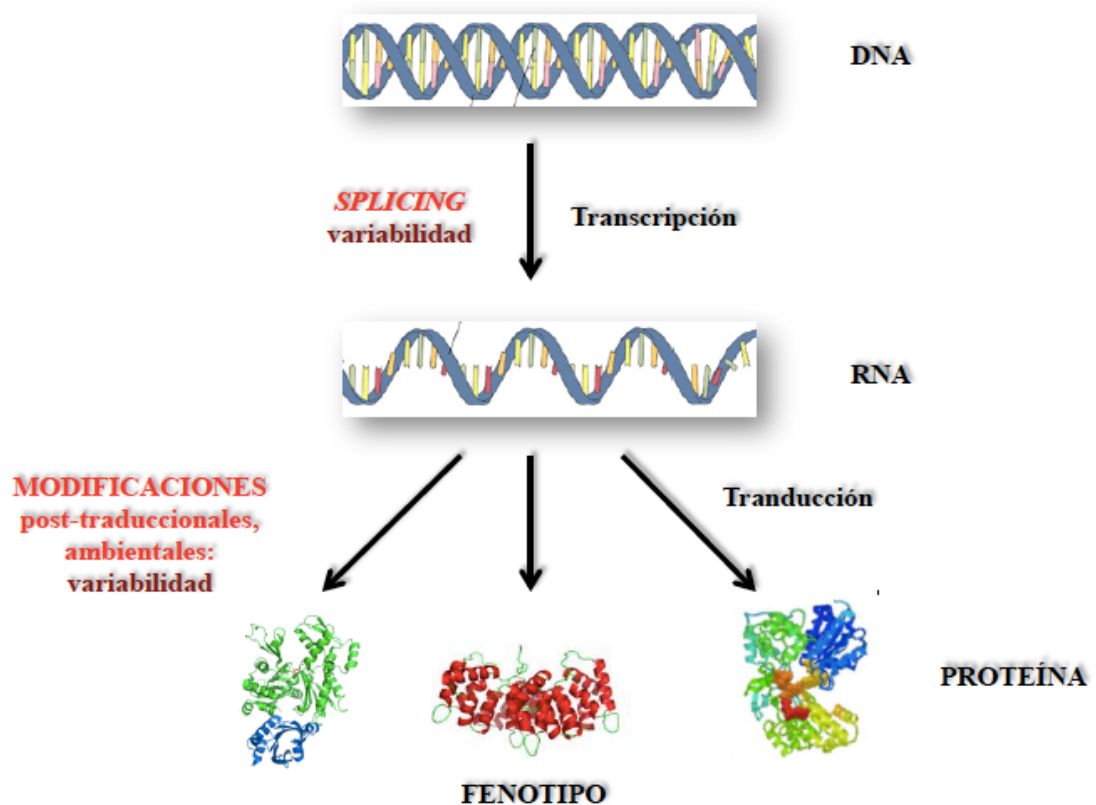


Figura 2.10. Esquema en el que se muestran los diferentes pasos en la expresión de proteínas y su variabilidad.

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y más diversas. Se considera que en el ser humano hay entre seis y siete veces más proteínas que genes (entre 200.000 y 250.000 proteínas). Las proteínas, a diferencia de los genes, tienen una complejidad y variabilidad mayores. Dado que poseen una función estructural,

enzimática, inmunológica, contráctil, homeostática, transductora de señales, etc, son indispensables para todas las funciones biológicas. Por ello, la investigación centrada en estos productos derivados del genoma, modificables en condiciones de enfermedad, es fundamental y probablemente nos permitirá entender la fisiopatología de enfermedades tan prevalentes como la arteriosclerosis.

En el momento actual nos encontramos en la era postgenómica, en la que la proteómica va a contribuir al entendimiento de la función de los genes⁽⁸⁵⁾. Precisamente porque frecuentemente es difícil predecir la función de una proteína basándose en la homología con otras proteínas, e incluso su estructura tridimensional, la determinación de los componentes de un complejo proteico o de una estructura celular es primordial en el análisis funcional. En este sentido, la proteómica es la tecnología más prometedora para avanzar en este área de interés. La integración genómica-proteómica permitirá comprender los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de una enfermedad.

Se estima que el genoma humano contiene entre 20.000 y 25.000 genes codificantes de proteínas, número muy inferior a las estimaciones iniciales. Sin embargo, las células humanas recurren ampliamente al *splicing* y a las modificaciones postraduccionales para producir varias proteínas distintas a partir de un único gen⁽⁸⁶⁾⁽⁸⁷⁾⁽⁸⁸⁾. De forma práctica, el genoma tan solo porta la información necesaria para una expresión perfectamente coordinada y regulada del conjunto de proteínas que conforman el proteoma. Mientras que el genoma es relativamente constante (incluso podría considerarse un componente estático de la célula), el proteoma está continuamente cambiando, muchas veces simplemente por la interacción del genoma con el entorno.

Todas estas modificaciones y otros cambios secundarios a estímulos ambientales (enfermedades, fármacos...) condicionan el desarrollo de diferentes mapas de expresión proteica, o lo que es lo mismo, diferentes fenotipos (Fig. 2.10), que, a su vez, proporcionan una gran diversidad y diferente susceptibilidad a determinadas enfermedades.

La proteómica utiliza la combinación de diferentes técnicas sofisticadas, incluyendo la 2-DE en gel de poliacrilamida, análisis de imagen, espectrometría de masas, secuenciación de aminoácidos y bioinformática para separar, identificar y caracterizar las proteínas⁽⁸⁹⁾. Con todo ello, la proteómica permite la obtención de una información cualitativa y cuantitativa: es posible determinar la existencia o no de una proteína y, además, cambios cuantitativos en su expresión comparando los resultados en la muestra basal y tras un estímulo o condición patológica, por ejemplo. Otra ventaja de esta técnica es la capacidad de detectar las distintas isoformas de una misma proteína (derivadas de las distintas modificaciones bioquímicas postraduccionales), circunstancia que no es posible utilizando el resto de técnicas de análisis e identificación de proteínas. Este punto es de gran importancia, ya que es posible que las isoformas de una determinada proteína tengan propiedades funcionales distintas a las de la proteína original.

La proteómica, sin embargo, va más allá de la mera catalogación de proteínas, pretendiendo establecer, en último término, su estructura, actividad biológica, modo de acción, localización celular, modificaciones postraduccionales e interacción con otras proteínas o moléculas. De esta manera, la comprensión de las situaciones fisiológicas nos permiten acercarnos al conocimiento de las condiciones patológicas. Desde un punto de vista

práctico son muchas las aplicaciones que se pueden vislumbrar en diversos terrenos científicos y biotecnológicos, pero la aplicación más llamativa (y con más impacto comercial) es el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico molecular y la medicina personalizada. De hecho, este aspecto de la proteómica está haciendo que la industria farmacéutica invierta grandes cantidades en el desarrollo de esta metodología y se esté avanzando rápidamente. Finalmente, se buscará construir un completo mapa tridimensional celular, con la localización de cada proteína y los procesos o cambios a los que pueden verse sometidas, ayudándonos todo ello a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso metabólico o patológico.

III. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Como se ha descrito previamente en la introducción de esta tesis, los aneurismas de aorta infrarrenal presentan en su evolución natural una tendencia a un crecimiento progresivo que puede finalmente conllevar la rotura del mismo. Aunque en el momento actual se desconoce la causa por la que unos AAA desarrollan un crecimiento más rápido, sí parece haberse demostrado que éstos presentan una mayor actividad inflamatoria en su pared, con una elevada actividad de las MMP, (en desbalance con sus inhibidores las TIMP), así como de TNF-A e IL-1.

Por otro lado, diversos autores han conseguido demostrar que existe una mayor captación de 18-FDG mediante el PET-TC en la pared aneurismática en determinados pacientes, lo que implica un proceso inflamatorio a dicho nivel, y que éstos presentan un incremento de actividad metabólica asociada a una elevada densidad de células inflamatorias en la pared. Además, esta captación se correlaciona con una mayor probabilidad de que los aneurismas sean sintomáticos y conlleven un mayor riesgo de expansión y rotura. Aunque otros autores dudan de esta correlación, la captación de 18-FDG mediante el PET-TC en los AAA se postula como un posible biomarcador de crecimiento de los AAA, pudiendo seleccionar aquellos casos en los que, a pesar de no presentar un diámetro suficiente según las recomendaciones actuales, deberían ser intervenidos de forma electiva.

Sin embargo, a pesar de haberse demostrado la reacción inflamatoria en la pared de los AAA que es detectada por la captación de 18-FDG en el PET-TC, aún se desconocen cuáles son los factores implicados en ese incremento

de actividad metabólica, dentro de los diferentes procesos que se desarrollan en el metabolismo energético celular (metabolismo aerobio, anaerobio, beta-oxidación, fosforilación oxidativa).

Por tanto, la hipótesis que se plantea en esta tesis doctoral sería la siguiente: la cuantificación de la expresión proteica de determinadas enzimas que actúan a nivel de dicho metabolismo celular en la pared aneurismática de aquellos pacientes con una mayor actividad inflamatoria demostrada mediante la captación de 18-FDG, podría ayudar a comprender el proceso por el cual estos pacientes pueden presentar un mayor crecimiento del AAA. La identificación de la alteración en la expresión estas enzimas podría suponer un avance en cuanto a la posibilidad de utilización de las mismas como biomarcador relacionado con una mayor probabilidad de expansión y rotura del AAA.

IV. OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente tesis son:

1. Comprobar si existe captación de 18-FDG mediante PET-TC en pacientes con aneurisma de aorta abdominal, que podría corresponder a un aumento de actividad metabólica en la pared aneurismática.
2. Evaluar si esa captación de 18-FDG se correlaciona con factores de riesgo cardiovascular (exceptuando la DM), o del propio aneurisma, como su tamaño o crecimiento del mismo.
3. Determinar si existen diferencias en la expresión de las principales proteínas implicadas en los diferentes procesos que se desarrollan en el metabolismo energético celular en la pared aneurismática con captación de 18-FDG frente a la pared que no presenta proceso inflamatorio, a diferentes niveles:
 - Metabolismo aeróbico y anaeróbico de la glucosa
 - Beta-oxidación de los ácidos grasos
 - Fosforilación oxidativa

V. MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente tesis se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* con el objetivo de demostrar diferencias en la expresión proteica del metabolismo energético celular en la pared aórtica de pacientes con aneurisma de aorta abdominal que presentan un aumento de actividad inflamatoria demostrada mediante la captación de 18-FDG con respecto a la pared aórtica de pacientes que no presentan dicha captación.

Estos estudios se realizaron en los Servicios de Angiología y Cirugía Vascolar, Medicina Nuclear, Inmunología y la Unidad de Investigación del Instituto Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Teniendo en cuenta los estudios publicados al respecto, estimamos que la muestra debería ser de 20 pacientes

V.A. Selección de pacientes

Se seleccionaron pacientes diagnosticados de aneurisma de aorta abdominal con indicación quirúrgica electiva por diámetro igual o mayor a 50 mm o diámetro menor pero con crecimiento demostrado de al menos 5 mm en los últimos 12 meses. Todos ellos eran candidatos a cirugía abierta convencional del aneurisma por bajo riesgo quirúrgico. Todos fueron informados del estudio y firmaron un consentimiento para la realización del PET-TC y extracción de muestras. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de nuestro centro. Se consideraron criterios de exclusión los siguientes:

- Pacientes diagnosticados de diabetes mellitus

- Pacientes diagnosticados de insuficiencia renal crónica (Creatinina mayor de 1,5 mg/dl), excepto aquellos en diálisis
- Pacientes diagnosticados de enfermedad inflamatoria sistémica
- Pacientes con realización reciente de TC abdominal (menos de un mes)
- Pacientes que, tras realización del PET-TC, fueron diagnosticados de patología oncológica, que obligara a cambiar la técnica quirúrgica abierta por la técnica endovascular

Se recogieron las siguientes características de los pacientes:

- Edad
- Sexo
- Factores de riesgo cardiovascular: hipertensión arterial (tensión arterial sistólica > de 140 mmHg o con tratamiento antihipertensivo), dislipemia (cifras de colesterol total >240 mg/dl, triglicéridos >150 mg/dl o ratio HDL/LDL < 0,3, o con tratamiento hipolipemiante), fumador (habitual o exfumador de menos de un año)
- Enfermedad coronaria (historia de angina de pecho, infarto agudo de miocardio o revascularización miocárdica quirúrgica o percutánea)
- Insuficiencia renal crónica en diálisis
- Tratamiento con estatinas o corticoides
- Antecedente de neoplasia o cirugía reciente abdominal (<12 meses)

Con respecto al aneurisma se recogieron las siguientes variables:

- Diámetro
- Crecimiento demostrado en el último año de al menos 5 mm
- AAA sintomático

- Tiempo desde el PET-TC hasta cirugía

V.B. Realización del PET-TC

El estudio se realizó con un equipo PET-TC Siemens Biograph TruePoint con una resolución espacial teórica de 3-4 mm que dispone de un TAC de 6 detectores (Fig 5.1).

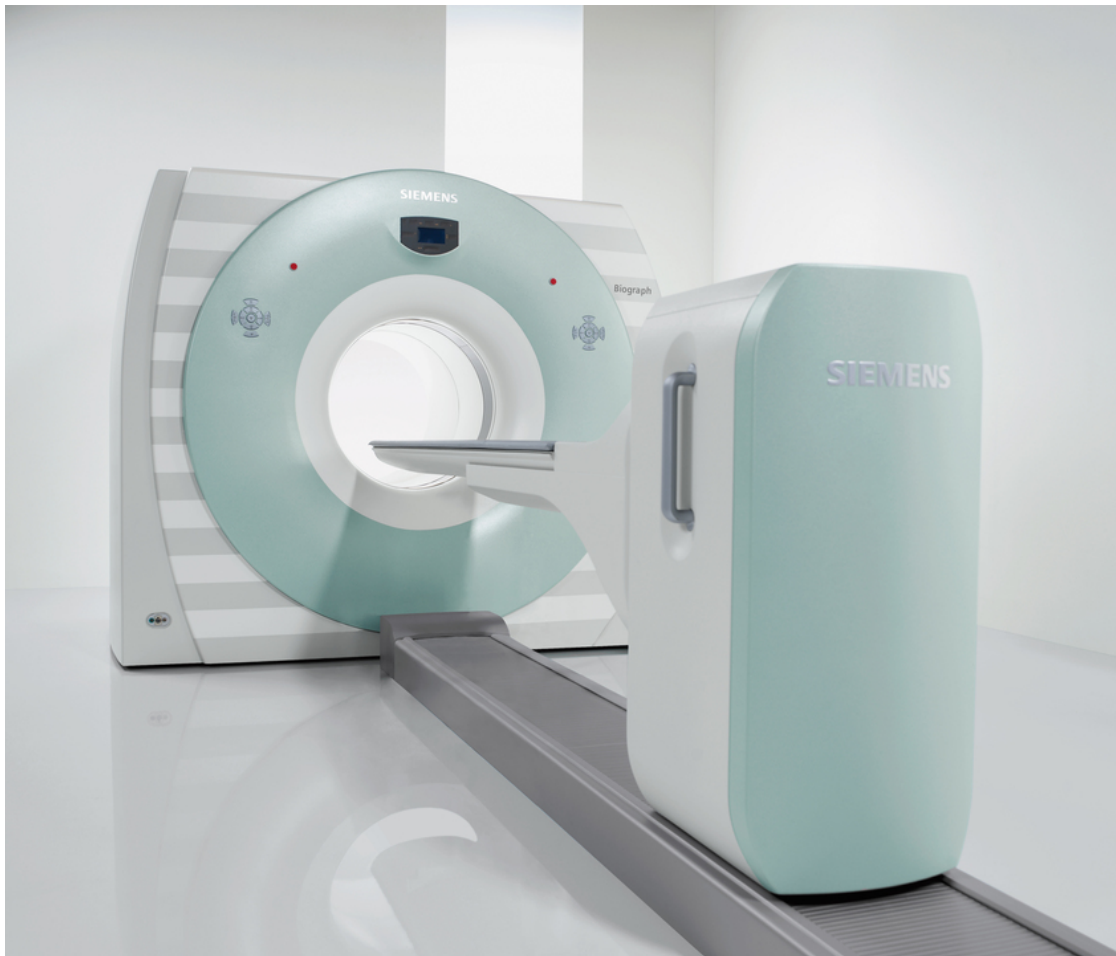


Figura 5.1: PET-TC Siemens Biograph TruePoint. [Healthcare.siemens.es](https://www.healthcare.siemens.es)

Previamente a la realización del estudio los pacientes mantuvieron un ayuno de 6 horas, pudiendo ingerir agua para favorecer la hidratación. Se evitaron fluidos intravenosos en ese período. Se realizó un test de glucemia basal a todos los pacientes siendo recomendable presentar glucemias no

superiores a 150 mg/dl. Los pacientes evitaron realizar ejercicio físico intenso en las horas previas a la realización del estudio.

Tras la administración de 3,7 MBq/kg de 18-FDG, los pacientes permanecieron durante un tiempo estimado de 45 minutos en reposo en una sala con ambiente cálido habilitada para ello. En primer lugar se realizó un TC sin contraste desde la base del cráneo a la raíz del muslo de 95 mAs, colocando los brazos hacia arriba y recomendando una respiración superficial para minimizar los artefactos cuando se realice la superposición de imágenes con el PET. A continuación se obtuvo un estudio de emisión PET desde la base del cráneo hasta el tercio superior del muslo. El tiempo de adquisición será de 3 minutos. Tras la adquisición del PET se realizó un TC con los mismos parámetros y la misma colocación que el primero, tras la administración de 100 ml de contraste intravenoso con una velocidad de inyección de 2,5 ml/segundo, y con un retraso de 50 segundos. Las imágenes se reconstruyeron con el modo iterativo (Fig.5.2), según los protocolos recomendados, incluyendo las correcciones acerca de la eficiencia del detector (normalización), tiempo muerto del sistema, las coincidencias aleatorizadas, así como la atenuación y la dispersión (*scatter*), que fueron determinadas a partir de las imágenes del TC⁽⁹⁰⁾. Posteriormente se archivaron las reconstrucciones, con y sin atenuación, para resolver potenciales artefactos derivados de la corrección de atenuación generados por el TC.

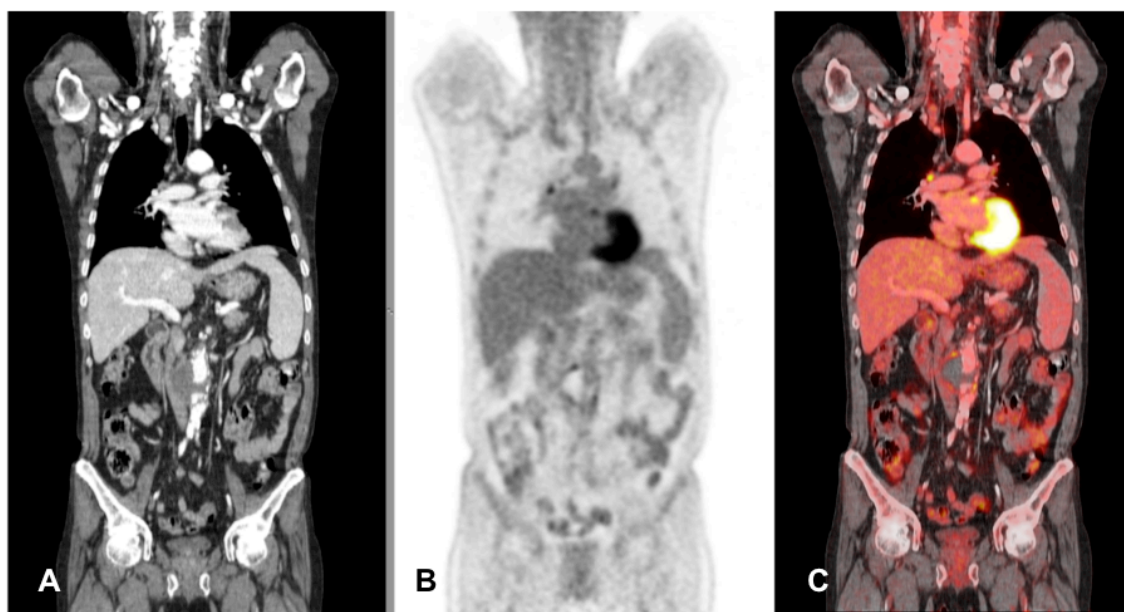


Figura 5.2. Corte coronal: A: TC.- B: PET.- C: PET-TC fusionados

Las imágenes del PET-TC fueron interpretadas al menos por un médico nuclear y un radiólogo. En caso de no consenso se requirió de la ayuda de otro médico nuclear y otro radiólogo. Ambos estudios se interpretaron de manera ciega. Se realizó en primer lugar una valoración visual general, estimándose la distribución fisiológica del 18-FDG, así como cualquier aumento de captación que sugiriera patología inflamatoria, infecciosa o neoplásica, que en algunos casos obligó a excluir al paciente del estudio, por precisar otras pruebas diagnósticas y tratamiento de las dichas patologías, o por cambio en la estrategia de tratamiento del AAA (pasando a realizarse la técnica endovascular o EVAR).

Posteriormente, se midió el número, la localización y el tamaño de la captación en aorta. En el estudio PET-TC se cuantificó mediante el *Maximum Standardized Uptake Value* (SUV) el grado de captación de la pared de la aorta. El SUV indica el metabolismo de la glucosa en las imágenes FDG-

PET/TAC en una región de interés (ROI) en relación con la media de captación de todo el organismo:

$$\text{SUV} = \text{Actividad media (ROI)(MBq/ml)} / \text{Dosis inyectada (MBq)} / \text{Peso (gr)}$$

La SUVmax se considera la máxima captación sobre una región concreta, en este caso sobre la aorta infrarrenal. Se consideró como captación positiva a una SUVmax mayor o igual a 2,5, de acuerdo con los estudios previos publicados⁽⁹¹⁾.

V.C. Obtención de muestras aórticas

Las muestras de tejido aórtico aneurismático, de al menos 2 cm² fueron obtenidas en quirófano durante la reparación aórtica electiva en pacientes, todos ellos intervenidos mediante cirugía abierta convencional.

En aquellos pacientes que no presentaron captación aumentada de 18-FDG, se obtuvo un fragmento de pared aórtica de la cara anterior del aneurisma. En los casos en los que se demostró captación elevada, se recogieron dos muestras. Una de ellas, de la zona de mayor captación, utilizando las imágenes del TC previo. La segunda porción se obtuvo de una zona sin captación, y lo más distante posible a la zona de extracción de la anterior. Las muestras de tejido fueron inmediatamente limpiadas de sangre, grasa y otros tejidos externos, lavados con suero salino isotónico y rápidamente congelados a -80° C hasta la determinación proteómica.

V.D. Determinación de expresión de proteínas

La expresión de las proteínas implicadas en el metabolismo energético celular, como lactato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, malato

deshidrogenasa, acil CoA deshidrogenasa, CPTs, UCP-1 y ATP-asa fueron analizadas por Western blot (WB).

V.D.1. Western blot

El WB, o *immunoblot*, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada, como puede ser una mezcla compleja de proteínas (un extracto tisular). Mediante la electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Posteriormente las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

V.D.1.1. Material empleado

- Papel de filtro
- Tampón *Laemmli* (1x)
- SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfato PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*) al 15%
- PBS para lavado
- Ácido bicinconínico (BCA)
- Azul de *Coomasie*
- Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF)
- Albúmina de suero bovino (BSA)

- Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*)
- Anticuerpos primarios
 - Anti-Triosa-fosfato isomerasa (TIM (FL-249):sc-30145)
 - Anti-Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa (Aldolasa A (N-15):sc:12059)
 - Anti- α -ATP sintasa mitocondrial (ATP5A (15H4):sc-58613)
- Anticuerpos secundarios
 - IgG anti-ratón (*General Electric Healthcare®*)
 - IgG anti-conejo (*Santa Cruz Biotechnology®*)
 - IgG anti-cabra (*General Electric Healthcare®*)
- *Kit ECL plus (Amersham, cod. RPN 2132)*
- Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*)

V.D.1.2. Preparación de las muestras

Los tejidos homogeneizados se solubilizaron en el tampón *Laemmli*, que contiene 2-mercaptoetanol. El tampón *Laemmli* está especialmente formulado para la preparación de muestras proteicas en los geles de poliacrilamida. La formulación de dicho tampón es la siguiente, con un pH de 6.8, aproximadamente:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%
- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%
- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS dota a todas las proteínas de carga positiva en un intervalo regular, confiriendo a cada proteína la misma carga negativa

total. De esta manera podemos separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. El SDS también desnatura las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la forma. Al añadir glicerol en el tampón se incrementa la densidad, consiguiendo que la muestra descienda hasta el fondo y minimizando, por tanto, pérdidas de proteína en el tampón. El 2-mercaptoetanol se utiliza para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación no por forma sino por tamaño. A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, haciendo más fácil su visualización. El *Tris*, es un componente habitual de los tampones y representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Posee una constante de disociación (pK_a) de 8.07 a 25 °C, lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simularemos las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano.

V.D.1.3. Electroforesis en gel

Las proteínas se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida o SDS-PAGE al 15% (w/v). En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteína (20 μg /pocillo), calculado mediante la reacción colorimétrica basada en la reacción del BCA (*Pierce*). Para asegurarnos de que cargábamos la misma cantidad de proteínas en el gel, se elaboró otro gel paralelo con muestras idénticas que posteriormente se tiñó con azul de *Coomassie* (colorante derivado del fenilmetano, $\text{C}_{47}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$). La solución de tinción contenía los siguientes componentes:

- Azul de *Coomassie*.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada hasta 500 ml.

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

V.D.1.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas

La transferencia de proteínas o *blotting* consiste en la inmovilización de dichas proteínas sobre membranas sintéticas para, a continuación, detectarlas mediante sistemas de tinción. En la técnica WB, después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Cualquier procedimiento de *blotting* consta de 5 etapas:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, que son proteínas.
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, o reactivos, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.

5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

El trabajo con proteínas fijadas sobre una membrana, en lugar de gel, tiene una serie de ventajas: son más rápidas de teñir y desteñir, se detectan cantidades menores de proteínas (pues se concentran en la superficie) y no se diluyen en todo el espesor del gel. Además, las membranas son más fáciles de manipular que el propio gel.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacríamida a una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion®-P*, Millipore), para lo que se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de glicina, 15% de metanol, 25 mM de *Tris* y agua destilada). Las membranas de tipo *Immobilion®-P* presentan una gran adsorción a las proteínas, por lo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Su estructura es de poro abierto, lo que facilita el acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45 μm , por lo que pueden utilizarse en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de > 20 kD (Fig. 5.3). Se sometieron a 20 V durante una hora. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.

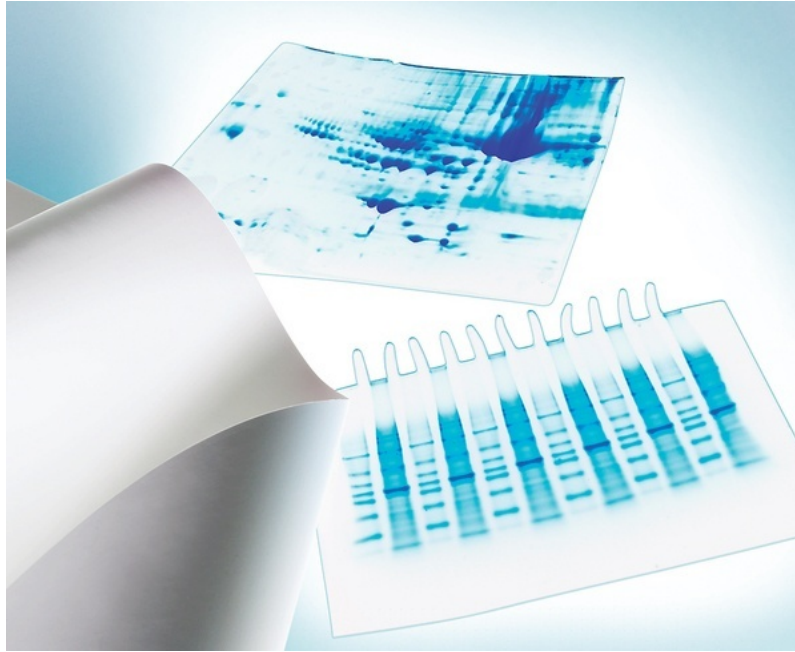


Figura 5.3. Imagen de una membrana de nitrocelulosa utilizada para Western Blot (*Immobilion®-P*, *Millipore*).

Dado que la membrana necesita poder unirse a proteínas de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (se bloquearon los lugares de unión que quedaron libres tras la transferencia) durante toda la noche a 4 °C con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*). En caso contrario, los anticuerpos empleados en la detección, de naturaleza proteica, podrían unirse a ellos dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína que se busca. El TBS-T es un tampón utilizado para mantener el pH en un rango relativamente estrecho. La formulación utilizada fue la siguiente:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l
- NaCl.....137 mmol/l
- *Tween-20*.....0.1%

El *Tris*, como se ha mencionado anteriormente, tiene una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así simular las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano. Al añadir ácido clorhídrico (HCl) podemos ajustar el pH hasta 5.2. El NaCl proporciona una concentración de sal isotónica. El polisorbato 20 o monooleato de Polioxietileno Sorbitan, conocido comercialmente como *Tween 20*, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea utilizado como detergente y emulsionante. En el experimento actual, lo utilizamos para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

V.D.1.5. Detección de proteínas

Tras el bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 12 horas a 4° C con anticuerpos monoclonales específicos unidos a una enzima que, en presencia de su sustrato, catalizó una reacción colorimétrica, haciendo patente la unión con el antígeno (la proteína) y su localización. Las proteínas de interés y los anticuerpos (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) utilizados son los siguientes: lactato deshidrogenasa (1:1000; SC-133123, Santa Cruz Biotechnology), piruvato deshidrogenasa (1:1000; SC-7140, Santa Cruz Biotechnology), malato deshidrogenasa (1:1000; MDHC (N-18): SC-49234, Santa Cruz Biotechnology), Acil CoA deshidrogenasa (1:500; SC-161304, Santa Cruz Biotechnology), CPT-I (1:2000; SC-20670, Santa Cruz Biotechnology) y UCP-1 (1:1500; sc-6529, Santa Cruz Biotechnology). Para la detección del complejo ATP sintasa (ATPasa) se utilizó la IgG_{2b} monoclonal de ratón cuyo antígeno es la ATP5A (cadena α) de origen bovino. Cada vial

contiene 100 μg de IgG2b in 1.0 ml de PSB con > 0.1% sodio y 0.1% de gelatina.

Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron de origen animal: Ig G anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000 (Fig. 5.4).

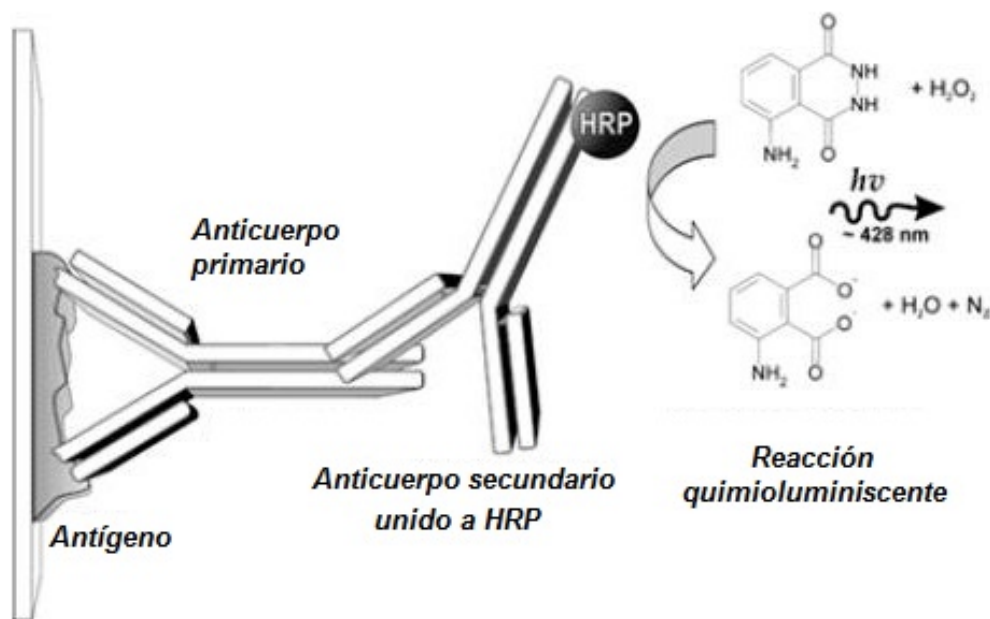


Figura 5.4. Detección de proteínas mediante la técnica *Western Blot*. HRP: peroxidasa de rábano.

V.D.1.6. Análisis

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada y se evaluaron por densitometría⁽⁹²⁾. Para la detección de proteínas por quimioluminiscencia se utilizó el sistema ECL[®](*Amersham Biosciences*), previo lavado con PBS. Consiste en un sustrato Lumigen[®] PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano. El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz. El *kit* incluye la Solución A (sustrato que contiene el tampón *Tris*) y la Solución B (sustrato del acridinio con dioxano y etanol). Las dos soluciones se mezclan en una proporción 40:1 (Fig. 5.5).

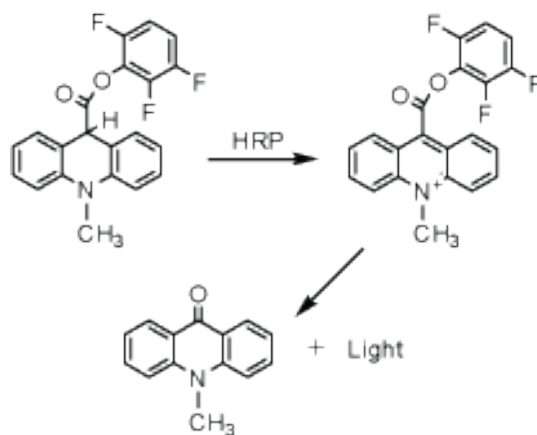


Figura 5.5. Esquema del proceso químico de la quimioluminiscencia.

Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción. Para la quimioluminiscencia se requirió la incubación de las membranas con el sustrato (ECL o luminol), para la posterior emisión de luminiscencia al ser

expuesto al *reporter* que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida fue captada por una cámara CCD, que tomó una imagen digital del WB.

La imagen se analizó por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (*Quantity One*®, Laboratorios *Bio-Rad*). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. Se utilizaron marcadores de peso molecular (*Sigma*®-*Aldrich*, *St Louis*, MI, USA) para el cálculo de la masa molecular, para monitorizar el progreso en la electroforesis y como control positivo para el análisis. Existe una gran variedad de marcadores de peso molecular para numerosas proteínas. En nuestro experimento utilizamos marcadores preteñidos, que contenían una mezcla liofilizada de proteínas con un rango de peso molecular entre 10.000-250.000 Da.

Con el fin de comparar la expresión proteica de las diferentes proteínas con la expresión de otra proteína constitutiva, se analizó también la expresión de la β -actina. Para ello, se corrió un gel paralelo con las mismas muestras y después de la transferencia a la membrana fue incubada con un anticuerpo monoclonal anti β -actina (1:2000, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis, USA).

V.E. Estudio estadístico

Los datos densitométricos de los WB, se expresaron en unidades arbitrarias de densitometría (UAD), que son valores relativos de una unidad de medida mostrando el ratio de una determinada cantidad de sustancia, intensidad u otras cantidades respecto a un valor de referencia. El valor de

referencia se establece en el laboratorio y sirve como referencia a múltiples medidas realizadas en un entorno similar. Los resultados fueron expresados como media \pm EEM. Se usó el test de Mann-Whitney para determinar las significaciones estadísticas. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., CA, USA).

VI. RESULTADOS

Se reclutaron 23 pacientes para el estudio, de los cuales tres de ellos fueron excluidos tras la realización del PET-TC por presentar hallazgos compatibles con patología neoplásica que obligaban a retrasar la intervención quirúrgica o bien cambiar la estrategia de la misma (tratamiento endovascular). En otros tres pacientes se objetivó captación patológica a otros niveles (dos de ellos en parótida y otro en seno piriforme), que, tras ser estudiados, no requirieron tratamiento de los mismos y fueron finalmente incluidos.

Los 20 pacientes que finalmente fueron incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos según presentaran captación elevada de 18-FDG con una SUVmax ≥ 2.5 (5 pacientes) o no la presentaran (15 pacientes). Todos fueron intervenidos de forma abierta (resección del AAA e interposición de injerto protésico), extrayéndose dos fragmentos de pared aórtica aneurismática en los 5 pacientes con captación aumentada (tal y como se recoge en el apartado Material y Métodos), y una muestra en los 15 restantes que no presentaban dicha captación.

Por tanto, se obtuvieron finalmente 25 muestras, 5 de ellas en zonas de captación elevada (Grupo Captación), y otras 20 en zonas sin ella (Grupo Control), en las que se realizó la determinación de las proteínas implicadas en el proceso metabólico e inflamatorio.

VI.A. Características basales de los pacientes y de los AAA

Las características basales de los pacientes, así como de los AAA, que fueron divididos en dos grupos, en función de la presencia (5 pacientes) o

ausencia (15 pacientes) de captación aumentada, se exponen en la siguiente tabla (Tabla 6.1).

Parámetros	Captación aumentada (n=5)	Ausencia captación (n=15)	p
Edad (años)	62.80 ± 7.66	66.47 ± 4.63	n.s.
Sexo (hombres)	4/5	14/15	n.s.
Tamaño del AAA (mm)	53.80 ± 9.09	60.87 ± 8.48	n.s.
Presencia de trombo	5/5	15/15	n.s.
Crecimiento demostrado del AAA	4/5	3/15	0.018
AAA sintomático	1/5	0/15	n.s.
Tabaquismo	5/5	14/15	n.s.
Hipertensión	5/5	14/15	n.s.
Dislipemia	4/5	10/15	n.s.
Cardiopatía isquémica	4/5	9/15	n.s.
Insuficiencia renal en diálisis	1/5	0/15	n.s.
Tiempo desde PET-TC a cirugía (días)	24.8 ± 8.5	29.3 ± 11.7	n.s.

Tabla 6.1: Características basales y comorbilidad de los pacientes, y características de los AAA

No se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos del estudio en cuanto a sexo, edad y presencia de factores de riesgo cardiovascular. Tampoco en cuanto a la presencia de trombo aneurismático, presente en todos los pacientes de ambos grupos. Sólo uno de los pacientes, incluido en el grupo de captación aumentada, presentaba un aneurisma sintomático. No hubo diferencias en cuanto al tiempo de demora entre la realización del PET-TC y la obtención de las muestras de la pared durante la intervención.

Sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere al crecimiento demostrado del aneurisma, cuya presencia ha

sido positiva en casi todos los pacientes (4 de 5, el 80%) que presentaron captación elevada, frente al grupo sin captación, donde sólo se ha demostrado crecimiento en el 20% de los pacientes ($p=0.018$), con un RR de 7,4 [IC 95%(1,02-54.31)]. Debe puntualizarse que esto no quiere decir que en el grupo de no captación los AAA no hayan presentado un crecimiento reciente, sino que éste no se ha podido demostrar, porque fueron intervenidos una vez diagnosticados del AAA al presentar un diámetro mayor de 50 mm. Sin embargo, sí es relevante que en casi todos los pacientes que han presentado captación aumentada ha existido un crecimiento, lo que indicaría una reacción inflamatoria en los mismos y una mayor actividad metabólica.

Este hecho podría explicar también la diferencia entre el diámetro del AAA en ambos grupos, aunque no llega a ser estadísticamente significativa, probablemente por el tamaño de la muestra. Aunque teóricamente el grupo de captación elevada debería presentar un mayor tamaño debido a una mayor posibilidad de expansión, en este grupo el diámetro ha sido menor ya que, al haber presentado un crecimiento reciente, se han intervenido sin esperar en algunos casos a tener ni siquiera 50 mm de diámetro

VI.B. Diferencias en las proteínas implicadas en el metabolismo energético celular

Tras determinarse la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo anaerobio y aerobio de la glucosa en los grupos de mayor captación y grupo control, se compararon los resultados entre ambos grupos. Las diferencias en cuanto a la expresión de lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvato deshidrogenasa (PDH) están representadas en la Fig.6.2

EXPRESIÓN LACTATO DESHIDROGENASA Y PIRUVATO DESHIDROGENASA EN TEJIDO AÓRTICO

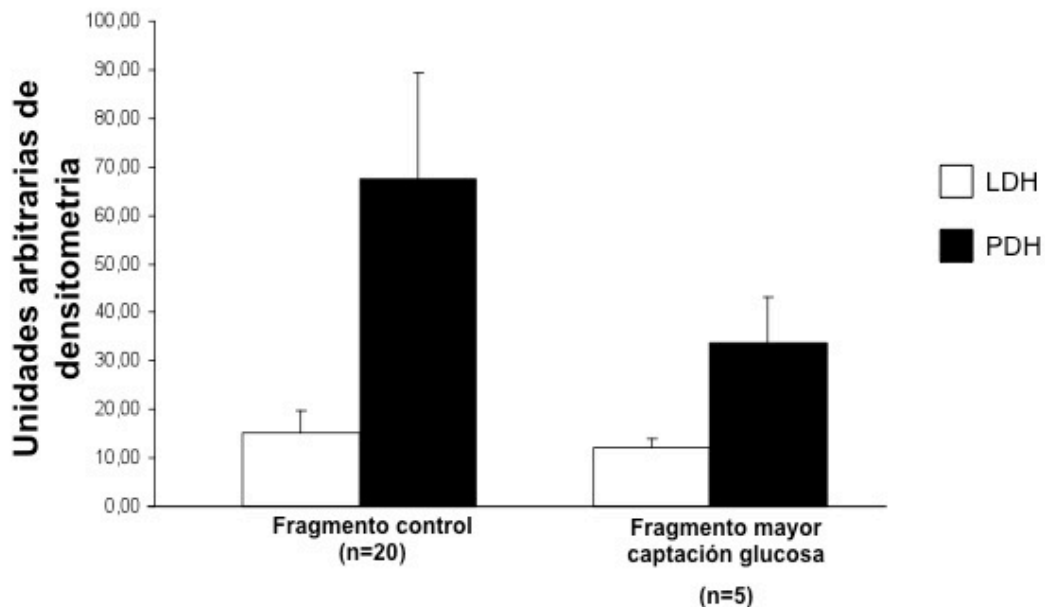


Figura 6.2. Expresión de LDH y PDH en grupos de mayor captación y control

Se observa una disminución no significativa en cuanto a la expresión de LDH (11.17 ± 2.09 UA vs 11.56 ± 0.84) y sobre todo de PDH (33.60 ± 5.81 UA vs 49.68 ± 4.57) entre ambos grupos, por lo que no parece que ese aumento de actividad metabólica sea a expensas del metabolismo anaeróbico.

Asimismo se cuantificó la expresión de la malato deshidrogenasa (MDH) I y II, enzimas clave en el ciclo de Krebs, obteniéndose los resultados en la Fig.6.3

EXPRESIÓN MALATO DESHIDROGENASAS EN TEJIDO AÓRTICO

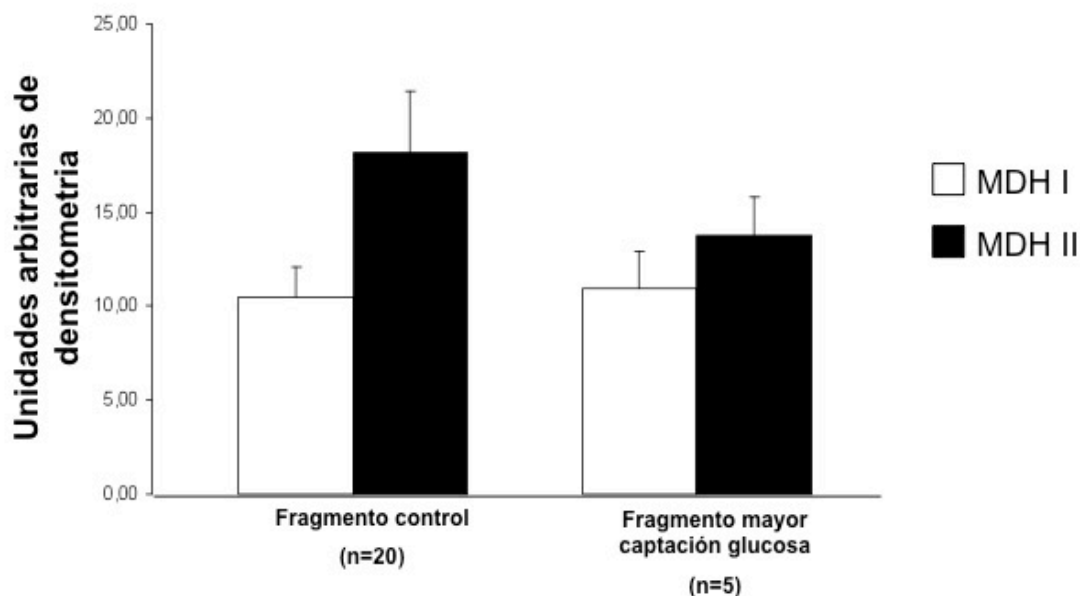


Figura 6.3. Expresión de MDH I y MDH II en grupos de mayor captación y control

De igual forma, en el caso de las MDH I y II, no existen diferencias significativas (10.39 ± 1.52 UA vs 9.43 ± 1.21 y 13.76 ± 2.35 UA vs 16.29 ± 1.59 respectivamente) entre el grupo con captación aumentada y el grupo control. Por tanto, ni el metabolismo anaerobio ni el aerobio se ven modificados en estos pacientes con mayor captación.

Para valorar el proceso de la beta-oxidación de los ácidos grasos, generador de acetil-CoA, que a su vez ingresa en el ciclo de Krebs, se han cuantificado tanto la acil coenzima-A deshidrogenasa (AcilCoA DH) como las proteínas transformadoras de ácidos grasos, las carnitina palmitoiltransferasas (CPT) I y II. Ambas determinaciones se muestran en las Fig.6.4 y 6.5

EXPRESIÓN ACIL COA DESHIDROGENASA EN TEJIDO AÓRTICO

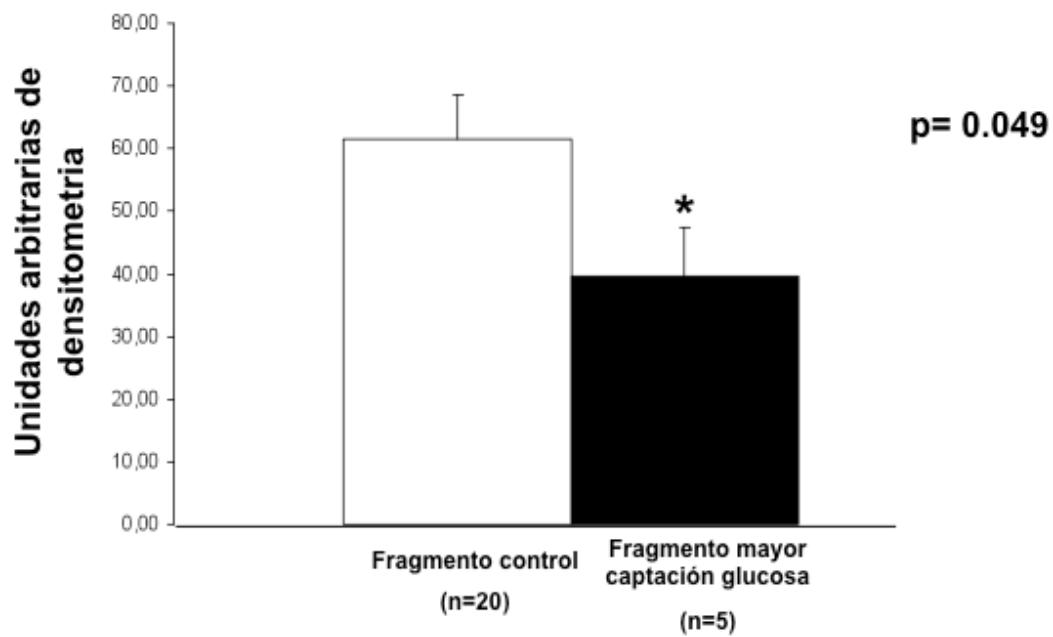


Figura 6.4. Expresión de AcilCoA DH en grupos de mayor captación y control

EXPRESIÓN CPTs EN TEJIDO AÓRTICO

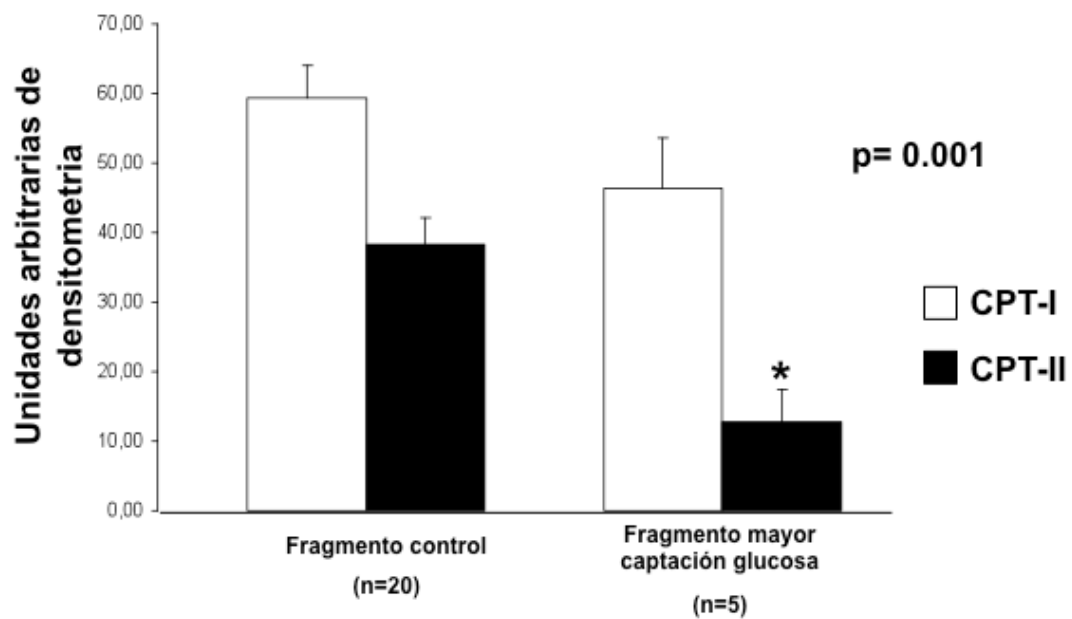


Figura 6.5. Expresión de CPT-I y CPT II en grupos de mayor captación y control

Se ha observado una disminución estadísticamente significativa de la expresión tanto de AcilCoA DH (32.80 ± 8.05 UA vs 55.58 ± 4.28 , $p=0.049$) como de CPT-II (12.68 ± 4.73 UA vs 38.30 ± 3.78 , $p=0.001$) en el grupo de captación aumentada, sin cambios en la CPT-I (46.34 ± 7.24 UA vs 57.04 ± 4.35). En estos pacientes el proceso de la beta-oxidación de ácidos grasos estaría disminuido de manera significativa, por lo que no estaría implicada como fuente de energía de la célula.

Por último, a nivel de la fosforilación oxidativa, se ha realizado la determinación de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), enzima que inhibe la actividad de la ATP-sintasa, disminuyendo la formación de ATP, y la propia expresión de ATP-sintasa. Ambas se muestran en la Figuras 6.6 y 6.7

EXPRESIÓN UCP1 EN TEJIDO AÓRTICO

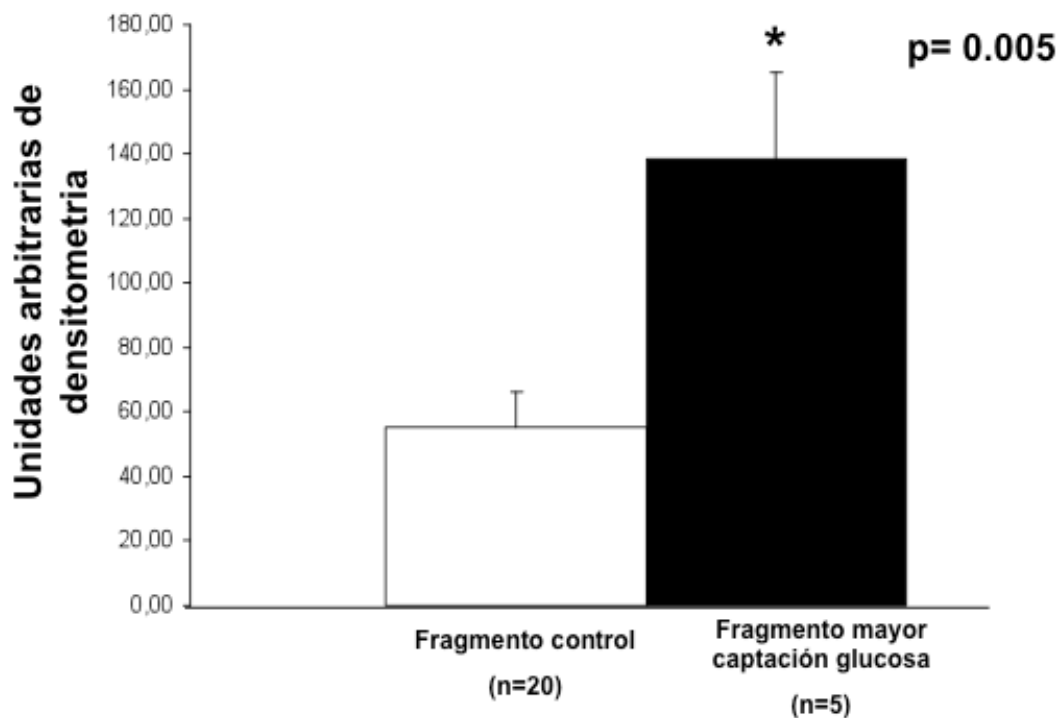


Figura 6.6. Expresión de UCP-1 en grupos de mayor captación y control

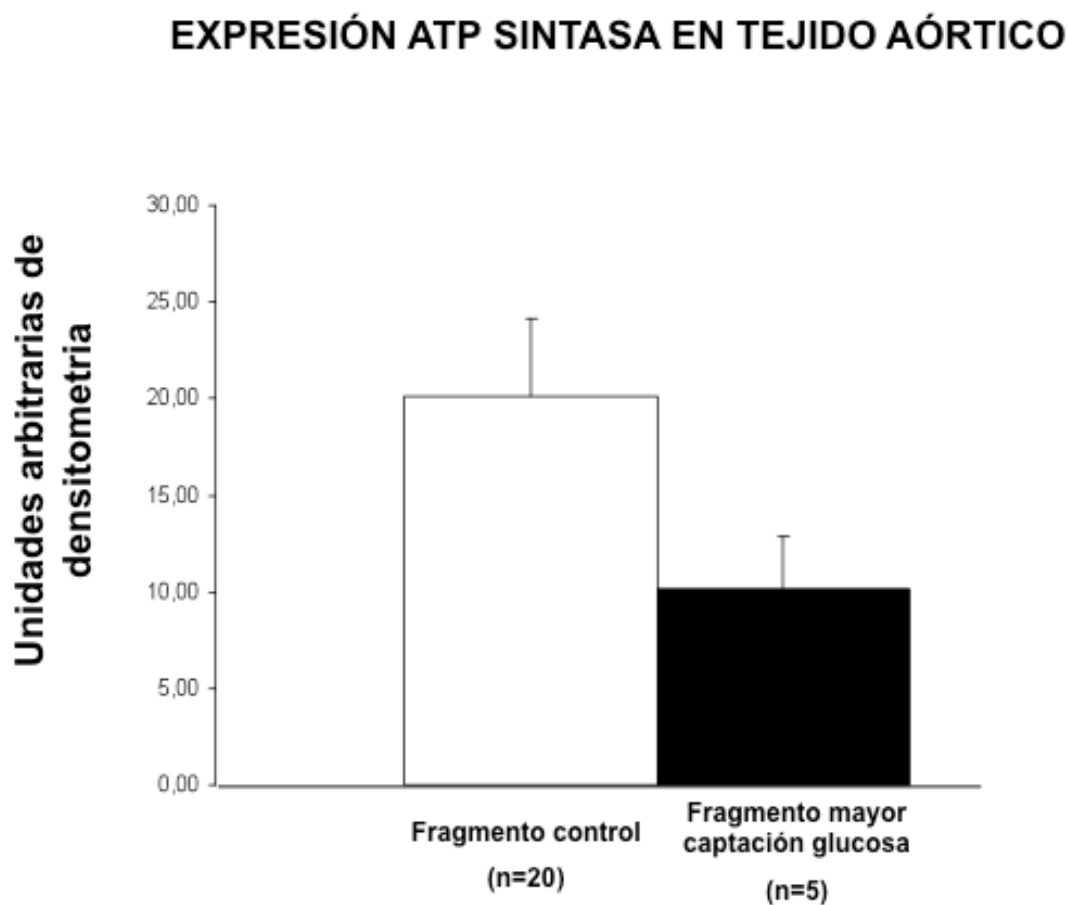


Figura 6.6. Expresión ATP sintasa en grupos de mayor captación y control

La expresión de UCP-1 está incrementada de manera significativa en el grupo de captación elevada ($138.64 \pm 26,57$ UA vs 55.05 ± 11.12 , $p=0.05$), por lo que se produce una reentrada de protones en la matriz mitocondrial. Esto implicaría una disminución de la formación de ATP por desacoplamiento de la cadena de fosforilación oxidativa, dado que estos protones no pueden ser utilizados por la ATP-sintasa. Esta enzima también está disminuida en el grupo de captación, aunque sin significación estadística, probablemente por el bajo tamaño muestral (10.17 ± 2.67 UA vs 20.11 ± 4.01). Todo ello estaría en

concordancia con el aumento de actividad inflamatoria observada en los fragmentos de aorta que presentaron una captación patológica de FDG.

Por tanto, la célula debería encontrar una fuente de energía adicional (que podrían ser los triglicéridos), ya que no parece utilizar el metabolismo de la glucosa como fuente de energía (ni aerobio ni anaerobio), ni la oxidación de ácidos grasos de cadena larga mediante la beta-oxidación.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis consistía, por un lado, en comprobar si la captación aumentada de FDG mediante el PET-TC en la pared aórtica de pacientes con AAA era una herramienta útil para comprobar si en estos pacientes existía una alteración en el metabolismo energético que originara una reacción inflamatoria en la pared aneurismática que pudiera conllevar un posible crecimiento y rotura del AAA. Por otro lado, intentar correlacionar esa posible captación elevada con los factores de riesgo cardiovascular habituales en los pacientes con AAA (excepto la DM), así como con las características del AAA (fundamentalmente diámetro y crecimiento del mismo)

Por último, el otro objetivo era cuantificar las proteínas implicadas en los procesos relacionados con el metabolismo energético celular, tanto a nivel de metabolismo aerobio como anaerobio, beta-oxidación y fosforilación oxidativa para determinar el posible origen de esa actividad inflamatoria. Todo ello iría encaminado a encontrar nuevos biomarcadores que pudieran estar asociados con la progresión (tamaño y riesgo de rotura) de los AAA.

VII.A. Biomarcadores en la patogenia de los AAA

En el momento actual aún no se encuentra claramente definido cuál es el mecanismo por el cual se originan los aneurismas, así como también se desconoce la causa por la que unos aneurismas experimentan un crecimiento más rápido con un mayor riesgo de rotura. La definición inicial de los aneurismas fue morfológica (dilatación localizada y permanente de una arteria que la lleva a tener un diámetro igual o superior al 150% del diámetro del

segmento arterial adyacente sano). Sin embargo, en la actualidad puede aplicarse una definición más fisiopatológica: la pérdida progresiva de la capacidad de resistir una alta presión intraluminal, debida a la degradación de la pared arterial⁽⁹³⁾. Dado que los AAA suelen ser asintomáticos, el principal reto en la actualidad consiste en diagnosticarlos en fase inicial, y descifrar los mecanismos biológicos responsables de la progresiva dilatación y posible rotura, para poder desarrollar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

Algunos biomarcadores son conocidos desde hace varios años⁽⁵⁵⁾⁽⁹⁴⁾. En términos fisiopatológicos, los biomarcadores circulantes pueden ser clasificados en relación con la actividad del trombo intraluminal, con la degradación de la matriz extracelular de la pared, y con la respuesta inmunoinflamatoria de la adventicia. El descubrimiento de nuevos biomarcadores puede venir a través de tecnologías como la proteómica⁽⁹⁵⁾.

Los primeros biomarcadores descritos estaban relacionados con la proteólisis de la matriz extracelular (peptidos de la elastina y propéptidos del procolágeno tipo III), aunque con una baja especificidad y sensibilidad⁽⁹⁶⁾. Posteriormente se describió la correlación de la elevación de complejos plasmina-antiplasmina, así como D-Dímeros circulantes con un mayor diámetro aórtico, grosor del trombo intraluminal y crecimiento del AAA⁽⁹⁷⁾.

Dado que en el trombo intraluminal se encuentran atrapados un gran número de neutrófilos, diversos marcadores de activación de neutrófilos circulantes están incrementados en los pacientes con AAA (complejos elastasa- α 1-antitripsina, mieloperoxidasa, α -defensina). De hecho, la α 1-antitripsina asociada a la lipoproteína de alta densidad (HDL), está disminuida

en pacientes con AAA. De la misma manera, los niveles plasmáticos de cistatina-C (un inhibidor de las metaloproteinasas), están disminuidos en relación inversa al tamaño del AAA. Por ello las metaloproteinasas, sobre todo la MMP-2 y la MMP-9, y sus inhibidores naturales, los TIMP, han sido considerados los biomarcadores más relevantes hasta ahora⁽³³⁾⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾.

Los marcadores circulantes de la activación plaquetaria también están elevados en los AAA, así como los complejos circulantes trombina-antitrombina. La asociación entre el aumento de biomarcadores tanto de la coagulación como de la fibrinólisis en pacientes con AAA demuestra la actividad biológica del trombo intraluminal⁽⁹⁸⁾. Sin embargo, los marcadores circulantes del estrés oxidativo todavía han de ser identificados y validados en los AAA.

Los biomarcadores inflamatorios circulantes, así como los inmunológicos están también elevados en estos pacientes. Las citoquinas inflamatorias plasmáticas, como el interferón- γ , el factor de necrosis tumoral- α , las IL-1 e IL-6, y la Proteína C Reactiva, están incrementadas en el plasma de pacientes con AAA, relevando un evidente proceso inflamatorio asociado al desarrollo del mismo⁽⁹⁹⁾⁽¹⁰⁰⁾.

Recientemente se ha publicado una revisión (Moris, 2014) en la que se resumen los nuevos biomarcadores implicados en la fisiopatología del AAA⁽¹⁰¹⁾, los cuales pueden correlacionarse con el proceso biológico asociado a la existencia (presencia/diagnóstico) y progresión (tamaño/riesgo de rotura) de los AAA. Muchos de los trabajos acerca de este amplio abanico de moléculas están aún en fase experimental o están limitados por presentar series cortas de

pacientes. Sin embargo, reflejan un proceso biológico asociado con esta enfermedad, y tienen un indudable interés para futuros estudios.

Se dividen en diferentes categorías:

- Biomarcadores relacionados con la Homeostasis o Proteólisis de la Matriz Extracelular: Cistatina-C y Catepsina, Fragmentos de Membrana Basal Circulantes, Osteoprotegerina, Tenascina-C (TN-C). Esta última contribuye a estratificar el riesgo en pacientes antes o después de la cirugía del AAA⁽¹⁰²⁾, aunque se necesitan más estudios para esclarecer la función de la TN-C y para evaluar si los niveles séricos o mediante imagen de la misma podrán ser útiles en valorar la actividad de la enfermedad.
- Biomarcadores relacionados con los Patrones de Señal Celular: Proteína C Reactiva (PCR), *Factor-Like* de Necrosis Tumoral Inductor Débil de Apoptosis soluble – *sTWEAK*). Este presenta una fuerte correlación tanto con la presencia de AAA como en la tasa de expansión. Sin embargo, no hay diferencia entre aneurismas grandes y pequeños⁽¹⁰³⁾.
- Proteínas liberadas por Trombo Intraluminal : Lipocalina Neutrófila Asociada a Gelatinasa, Peroxiredoxina-1 (PRX-1), Factores de Crecimiento *Insulina-Like (IGF-like)* y sus proteínas enlazadas. Este grupo parece ofrecer los resultados más prometedores debido a su correlación estadística con el diámetro y crecimiento del AAA⁽¹⁰⁴⁾⁽¹⁰⁵⁾.
- Biomarcadores relacionados con las Células Circulantes: Linfocitos, Monocitos, Células Progenitoras, Linfangiogénesis, Catalasa, Patógenos
- Metabolitos: Vitamina D y Proteína enlazada a Vitamina D, Homocisteína, Lipoproteínas y Receptores relacionados a las

Lipoproteínas; Fosfolipasas, Hierro. Probablemente se puedan correlacionar con la detección precoz del AAA, aunque no está claro en la literatura si se afectan por el estado metabólico del AAA (ya que la mayoría de los pacientes son fumadores y presentan HTA y/o dislipemia, que a su vez son factores de riesgo para desarrollar un AAA). Sin embargo, algunos metabolitos pueden ser útiles en la detección precoz del AAA ⁽¹⁰⁶⁾.

- Biomarcadores Genéticos: Longitud de Telómero, Cromosomas 19q13 y 9p21, Receptores de Quemoquinas. Aunque no presentan resultados significativos, estos biomarcadores se postulan como un campo de investigación futura en el estudio del AAA.

Sin embargo, ninguno de los biomarcadores mencionados abarca la combinación de todos los eventos fisiopatológicos que generan un AAA y la expansión del mismo, por lo que no existe ninguno que simultáneamente sea indicativo de presencia de trombo intraluminal, inflamación y proteólisis, y que nos permitan el diagnóstico de la enfermedad, así como monitorizar su progresión. En definitiva, se necesitan más estudios, y sobre todo con un mayor número de pacientes, para valorar estos biomarcadores y su relación coste-beneficio.

VII.B. Contribución del PET-TC en la evaluación del AAA

Dado que la captación de 18-FDG detectada mediante el PET-TC se ha utilizado para evaluar la actividad hipermetabólica celular en tumores y enfermedades inflamatorias, autores como Paraskevas la consideran dicha

captación como un posible biomarcador útil en detección del proceso inflamatorio implicado en el crecimiento de los AAA⁽⁵⁷⁾.

VII.B.1. PET-TC y enfermedad arterial

La utilización cada vez más frecuente del PET-TC en el diagnóstico y estadiaje de la patología tumoral ha conllevado la posibilidad de observar captación aumentada de 18-FDG en otras zonas del organismo, especialmente en las arterias⁽¹⁰⁷⁾. Ya en 2001, Yun demostró que la tasa de captación positiva en grandes vasos era cercana al 50%, y que dicha captación se incrementaba con la edad⁽⁶⁴⁾

Desde entonces, está siendo cada vez más utilizado en la evaluación de diversas patologías de la aorta. Sin embargo, existen diferentes patrones de captación del 18-FDG a nivel arterial dependiendo de la patología⁽¹⁰⁸⁾.

1.- Aterosclerosis: en los vasos ateroscleróticos, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad produce una destrucción de células endoteliales, lo que conlleva a una migración de monocitos y linfocitos T hacia la íntima. Los monocitos se transforman en macrófagos, que son activados por los linfocitos. La captación de 18-FDG se produce sobre estos macrófagos activados⁽¹⁰⁹⁾. Diversos trabajos demostraron la elevada captación de FDG en la placa de ateroma inestable en la carótida, así como la correlación con cifras elevadas de MMP-1 circulante⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾. De hecho, algunos estudios comprobaron que las placas sintomáticas neurológicamente presentaban mayor captación con respecto a las asintomáticas⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾. Esto sugiere que el PET-TC podría tener una utilidad clínica en la monitorización de la placa de ateroma⁽⁷¹⁾.

Para reafirmar esta teoría, en 2009, Ruud publicó un interesante trabajo prospectivo en el que se valoró la presencia de inflamación de la placa de ateroma en diferentes arterias del organismo (carótidas, aorta, iliacas y femorales), reflejada mediante la captación de 18-FDG, e intentando correlacionarla con la presencia calcificación arterial, de factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de inflamación sistémica. La captación en dichas arterias fue mayor en pacientes con cardiopatía isquémica y mujeres. Los pacientes con mayor captación presentaron mayores concentraciones de biomarcadores séricos (MMPs). La calcificación no se correlacionó con el proceso inflamatorio, considerándola por tanto una fase tardía de la aterosclerosis⁽¹¹¹⁾.

2.- Aortitis y vasculitis: en la aortitis, las principales lesiones inflamatorias se originan en la media o en la adventicia debido a la infiltrado celular de linfocitos T, monocitos o granulocitos. Generalmente el 18-FDG se acumula en este caso en los monocitos. En la aortitis activa, la captación es más elevada que en el hígado⁽¹¹²⁾. La primera utilización del PET para la vasculitis se describió en 1999⁽¹¹³⁾.

- La periaortitis crónica (entidad que engloba fibrosis retroperitoneal idiopática, aneurisma de aorta infrarrenal inflamatorio y fibrosis perianeurismática), el 18-FDG se acumula en los monocitos de la adventicia y la fibrosis periaórtica.

- En la arteritis de células gigantes, la captación de 18-FDG en grandes vasos, especialmente aorta torácica, es un hallazgo con una elevada

sensibilidad y especificidad (con un VPP del 93% y un VPN del 80%) para esta patología⁽¹¹⁴⁾.

- Con respecto a la arteritis de Takayasu, el incremento de 18-FDG permite la detección de la inflamación activa en la aorta en pacientes en fase inicial de esta patología⁽¹¹⁵⁾, así como una prometedora técnica para evaluar la respuesta al tratamiento.

- En las aortitis infecciosas, que habitualmente derivan en aneurismas infecciosos o *micóticos*, se ha empleado también el PET-TC, demostrándose una mayor captación en estos pacientes con respecto a aneurismas no infecciosos⁽¹¹⁶⁾.

3.- Disección aórtica: son bien conocidos los procesos proteolíticos e inflamatorios que se presentan en la pared aórtica en la disección aguda⁽¹¹⁷⁾. En este caso, la activación de las plaquetas hace que las selectinas se redistribuyan por la superficie plaquetar e inicien su adhesión a los leucocitos, donde se acumula el marcador. En 2010, un trabajo prospectivo publicado por Kato, se apreció una mayor captación de 18-FDG tanto a nivel proximal como distal de la disección, y sobre todo a nivel del punto de mayor diámetro aórtico, correlacionándose este último hallazgo con una peor evolución de estos pacientes, por lo que concluyó que el PET-TC podría tener un papel relevante en el pronóstico de la disección aguda tipo B, por lo que se podrían seleccionar pacientes que precisaran tratamiento quirúrgico a pesar de no estar inicialmente complicadas⁽¹¹⁸⁾. En algunos casos, tras un hallazgo de una disección aórtica estable y no complicada, es difícil saber si se trata de una

disección aguda o crónica. Reeps presentó un trabajo para valorar la utilidad del PET-TC en cuanto a su capacidad de diferenciar entre ambos procesos. Obtuvo unas diferencias significativas en cuanto a la captación de 18-FDG en pacientes con disección aguda, más elevados no solamente en la pared aórtica, sino también en el septo entre ambas luces, por lo que concluyó que el PET-TC podía ser útil en cuanto a la diferenciación entre disección aguda y crónica⁽¹¹⁹⁾.

4.- Infección protésica: puede observarse captación aumentada en zonas con activación de granulocitos⁽¹⁰⁸⁾. En 2005, en un trabajo publicado por Fukuchi, el PET-TC obtuvo una sensibilidad del 91% y una especificidad del 95% con respecto al diagnóstico de infección de injerto protésico⁽¹²⁰⁾. Posteriormente otros estudios corroboraron la utilidad de esta prueba, aunque remarcaron la posibilidad de falsos positivos⁽⁶³⁾. De hecho, una es frecuente una captación moderada en el seguimiento de los injertos protésicos, relacionándose con la presencia de neointima. Se han descrito casos de captación elevada en prótesis que se trombosaron de forma aguda días después y en los que se descartó posteriormente infección de la misma, por lo que se ha sugerido que el PET-TC podría detectar injertos en riesgo de posible trombosis futura⁽¹²¹⁾.

5.- Aneurismas aórticos: en ocasiones los AAA se caracterizan por una inflamación transmural que implica a linfocitos y macrófagos, y el 18-FDG se acumula en estos últimos, por lo que un aumento del proceso inflamatorio de la pared aneurismática puede ser captada por el PET-TC. De hecho, la ausencia de captación en la misma podría indicar que el

AAA está estable, mientras que la presencia de la misma indicaría una inestabilidad de la pared, con una posible asociación con la expansión del AAA y posterior rotura, tal y como describió Sakalihasan en 2002⁽⁷²⁾.

Esta posible asociación ha sido estudiada ampliamente en la última década, por lo que se detallará más ampliamente en el siguiente apartado.

VII.B.2. PET-TC y proceso inflamatorio en el AAA

En 2002, Sakalihasan planteó por primera vez una posible relación entre la hipercaptación de 18-FDG mediante el PET-TC en la pared aneurismática con la expansión y rotura del AAA⁽⁷²⁾. En un grupo de 26 pacientes diagnosticados de AAA. Destacaba entre ellos que 11 eran de más de 70 mm de diámetro, 11 eran sintomáticos, 4 eran inflamatorios, y 6 habían presentado un crecimiento rápido. A todos ellos se les realizó un PET-TC tras 60 minutos de la inyección de 18-FDG. Se analizó la captación visual del mismo. 10 pacientes presentaron captación aumentada del radiomarcador, de los cuales 4 habían sido intervenidos recientemente por otras patologías (prostatectomía, nefrectomía, sigmoidectomía y endarterectomía carotídea). 5 pacientes de este grupo precisaron intervención urgente por rotura del AAA, dolor lumbar severo o rápida expansión. De los 16 pacientes en los que no se detectó aumento de captación, solamente un caso fue había sido intervenido recientemente (revascularización coronaria). Los autores concluyeron que, con este estudio preliminar, la captación mediante PET-TC en la pared aneurismática sugería su asociación con una rápida expansión del AAA, con una cirugía reciente y con procesos neoplásicos malignos. Esta relación se justificaba por la activación de

células inflamatorias que se produce tras una intervención quirúrgica, con un aumento en la producción de la actividad de las colagenasas y elastasas en la pared aórtica, que ya ha sido documentada en diversos estudios poblacionales⁽¹²²⁾. Con respecto a la relación con procesos neoplásicos, se ha descrito una alteración de las proteínas del tejido conectivo en estos pacientes, con un incremento de la actividad de las MMPs, lo cual podría conllevar a un incremento de células inflamatorias en la pared y a una inestabilidad del AAA con expansión del mismo⁽¹²³⁾. Sin embargo, el mecanismo desencadenante no está aún definido. Sin embargo, en cuanto a los aneurismas inflamatorios (AAAI), no hubo diferencias en cuanto a la captación de 18-FDG (dos casos captaron y otros dos no). Esto parece deberse a que sólo algunos de los AAAI contienen un denso infiltrado de macrófagos asociado al habitual colección de linfocitos periadventiciales, que es predominante en todos ellos. Los autores, por tanto, plantean la necesidad de investigar la actividad metabólica en la pared aneurismática tras realización del PET-TC, realizando un análisis morfológico y bioquímico de fragmentos de pared aórtica para obtener más información acerca de la patogenia de la enfermedad aneurismática y su evolución.

A partir de la publicación de este artículo, han sido diversos los autores que han tratado de valorar la utilidad del PET-TC en el AAA y su correlación con los procesos metabólicos e inflamatorios que pueden conllevar la expansión y rotura del mismo . La controversia generada en cuanto a dicha hipótesis nos ha servido para plantearnos nuestros objetivos en este estudio. A lo largo de esta discusión expondremos los trabajos más relevantes, tanto a favor como en contra, de la utilidad del PET-TC en esta patología.

Ha habido diversos estudios experimentales para intentar demostrar la utilidad del PET-TC en la valoración del proceso inflamatorio de los AAA. En 2011, Nahrendorf publicó un estudio en ratones con aneurismas inducidos mediante la administración sistémica de angiotensina-II. El tamaño del aneurisma fue determinado mediante TC, y se realizó un PET-TC tras la infusión de 18-CLIO (partículas de óxido de hierro marcadas). Posteriormente se analizaron las aortas para realizar la cuantificación de monocitos y macrófagos en la pared de las mismas. La captación de la señal del PET fue significativamente más elevada en las aortas aneurismáticas con respecto a las de diámetro normal, y en las zonas de captación se demostró una mayor presencia de monocitos y macrófagos. Por tanto, los autores concluyen que el PET-TC pudiera ser una herramienta útil para la cuantificación del contenido de macrófagos en la pared aneurismática⁽¹²⁴⁾. Según algunos autores, este estudio plantea la posibilidad un diagnóstico más rápido en cuanto a la progresión de la enfermedad aneurismática y también la posibilidad de valoración de respuesta a determinados tratamientos farmacológicos de la misma. Sin embargo, no soluciona alguna de las cuestiones relevantes, como la heterogenicidad de los monocitos y macrófagos en la pared, por lo que en algunos casos es complicado determinar la progresión o regresión tanto de la aterosclerosis como del proceso inflamatorio de los AAA⁽¹²⁵⁾.

En 2012, Sarda-Mantel presentó un trabajo comparando diferentes métodos de captación mediante PET-TC de los leucocitos activados: 18-FDG, 18-FCH (fluorometilcolina) y 18-DPA714 (un antagonista del receptor de benzodiazepina periférica). Para ello se indujo un AAA en 46 ratas Lewis mediante la implantación nortotópica de una aorta decelularizada de cerdo

guinea. El AAA se desarrolló en 35 de los casos. En las ratas con AAA inducido, caracterizados por una importante actividad de los leucocitos, el PET mediante la captación de 18-FDG presentó una mayor sensibilidad que la obtenida por el 18-FCH y por el 18-DPA714, por lo que se le suponía de potencial interés para la evaluación pronóstica en los AAA⁽¹²⁶⁾.

Un reciente trabajo ha sido publicado por English, en 2015, en el que se indujo un AAA en 24 ratas mediante exposición de elastasa porcina pancreática intratortica, y posteriormente se indujo la rotura del AAA mediante la administración de β -aminoprionitrilo subcutáneo. Hubo un grupo control con 15 ratas a las que también se les indujo el AAA pero no se provocó la rotura. Hubo otro grupo control en ratas en las que no se consiguió la rotura del AAA (9 casos). Perviamente se les había realizado a todos los animales un PET-TC con 18-FDG, determinándose la SUVmax. Se analizaron posteriormente en las muestras de pared diferentes interleuquinas (IL-1 β , IL-6, IL-10), y MIP-2, así como concentraciones de PAI-1, uPA, y tPA. También se cuantificaron las poblaciones de macrófagos y la actividad de las MMPs. En los AAA rotos, se detectaron focos aumentados de captación en las zonas posteriores de rotura. Asimismo, se pudo comprobar en ellos expresión disminuida significativamente de PAI-1 y tPA, similar de uPA. En los AAA rotos, también se demostró mayor expresión de IL-1 β , IL-6, IL-10 y MIP-2, así como mayor presencia de macrófagos, neutrófilos, y una actividad aumentada de las MMP-9. Por tanto, los autores concluyen que la elevada captación prerrotura en este estudio experimental se asoció con un aumento del proceso inflamatorio en la pared aneurismática, por lo que podría ser válido para monitorizar los cambios inflamatorios antes de la rotura del AAA⁽¹²⁷⁾.

Sin embargo, más relevantes resultaron los trabajos con series de pacientes. Ya en 2008, Reeps publicó una serie de 15 pacientes con enfermedad aneurismática, 12 asintomáticos y 3 sintomáticos. 13 pacientes presentaban AAA y los 2 restantes presentaban un aneurisma toracoabdominal (AATA) aunque con la mayor dilatación en la zona infrarrenal. 7 pacientes habían presentado crecimiento del AAA (≥ 3 mm anual). A su vez se analizó un grupo control de 24 pacientes sin AAA. A ambos grupos se les realizó un PET-TC, 90 minutos después de la inyección del 18-FDG. El análisis de la captación se realizó mediante la SUVmax. Posteriormente se extrajeron muestras de la zona de pared aneurismática de mayor captación, se realizó estudio inmunohistológico y se analizaron semicuantitativamente para valorar infiltrados inflamatorios, CML, MMP-2 y MMP-9, y fibras de colágeno y elastinas. En el grupo control, la captación fue significativamente menor (SUVmax media de 3), en comparación con el grupo de pacientes con AAA asintomático (SUVmax media de 3.5), y sobre todo con el grupo de pacientes con AAA sintomático (SUVmax media de 7.5), aunque no se encontró asociación entre una mayor captación y crecimiento del AAA o diámetro del mismo. Sí se demostró correlación entre captación elevada y una mayor densidad de infiltrado inflamatorio, macrófagos y linfocitos-T, así como con una mayor expresión de MMP-9, y con una reducción de fibras colágenas y CML. Por tanto, y a pesar de la limitación que conlleva la baja muestra, sobre todo de pacientes sintomáticos, los autores concluyen que la captación elevada de 18-FDG en la pared aórtica se correlacionaba con el proceso inflamatorio, con sus características histopatológicas, con una elevación de la expresión de MMPs que conllevan a una inestabilidad de la pared y a la presentación de síntomas

del AAA, postulando al PET-TC como una técnica diagnóstica útil en la predicción individual de rotura de los mismos⁽⁷⁴⁾.

También en 2008, Trujiens realizó un estudio en 34 pacientes (17 con AAA ≥ 30 mm, asintomáticos, y un grupo control de otros 17 pacientes sin AAA) en una base de 278 pacientes a los que se les había realizado un PET-TC para estadiaje de cáncer de pulmón primario. El período entre la inyección del trazador y la realización del PET fue de 60 minutos, y el análisis de la captación fue mediante la SUVmax. Los pacientes con AAA presentaban una captación significativamente mayor que aquellos con aortas de diámetro normal (SUVmax media de 2.52 frente a 1.78, respectivamente). No hubo diferencias entre pacientes en tratamiento con estatinas o corticoides. En el grupo de AAA, no hubo correlación significativa entre el grado de captación y el diámetro aórtico. Como limitaciones del estudio, los autores adujeron la posibilidad de falsos positivos debido a que la población estudiada, con enfermedad neoplásica, pudiera presentar áreas focales de inflamación o infección asociadas a la misma. Sin embargo, los autores concluyeron que el PET-TC constituía una prometedora técnica para identificar áreas de inflamación en la pared de aorta aneurismática, independientemente del tamaño del AAA⁽¹²⁸⁾.

Posteriormente, en 2009, Kotze intentó demostrar la alteración del metabolismo de la glucosa en la pared aneurismática, mediado por las proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) un artículo con una serie prospectiva de 14 pacientes con AAA, la mayoría de ellos (12 casos) de pequeño tamaño, con un diámetro ≤ 55 mm. Uno de los pacientes era sintomático y dos de ellos eran AAAI. 7 pacientes habían experimentado un crecimiento en el último año (aunque solamente 2 de ellos era de ≥ 6 mm,). Se

realizó el PET-TC, 120 minutos después de la inyección del 18-FDG, , analizándose las imágenes y obteniéndose un *score* para calcular la calcificación del AAA. El análisis de la captación se realizó mediante SUVmax, considerándose elevada con un valor ≥ 2.5 . Casi todos los pacientes (12 de ellos) presentaron una captación aumentada. No se encontró correlación significativa entre el grado de captación y el crecimiento del AAA, ni con el diámetro del mismo, ni con el grado de calcificación. Sí presentaron captación elevada los 2 pacientes con AAI de manera significativa. Entre las limitaciones del estudio, está el hecho de considerar crecimiento del AAA en el último año si éste ha sido de ≥ 3 mm, a la hora de intentar correlacionar el grado de captación con dicho parámetro. Los autores concluyen, por tanto, que la pared aneurismática muestra un metabolismo de la glucosa aumentado, mediado por los GLUTs, y que esta actividad metabólica está presente en la mayoría de los AAA, y es detectada por el PET-TC⁽¹²⁹⁾.

También en 2009, Xu realizó un estudio para determinar la asociación entre una elevada actividad metabólica en la pared del aneurisma y el estrés de la misma que pudiera provocar la rotura del mismo. Para ello realizó un examen PET-TC a 5 pacientes con enfermedad aneurismática, uno con aneurisma de aorta torácica (AAT) descendente, dos con AATA y dos con AAA. Tras la inyección del 18-FDG, 60 minutos después se realizó la prueba. Se realizó un análisis de la imagen y se definió una captación elevada cuando la SUVmax era ≥ 2.5 . Posteriormente se realizó un modelo específico de cada paciente mediante una reconstrucción en 3-D del TC. El análisis de estrés de la pared se realizó un código de elementos finitos, ADINA 8.2 (Automatic Dynamic Incremental Nonlinear Analysis. Se compararon cualitativamente los

niveles de captación del radiotrazador con los niveles de estrés previstos. Ninguno de los 2 pacientes con AATA se intervino, y uno de ellos presentó una rotura del aneurisma 8 meses más tarde. De los dos pacientes con AAA, uno se reparó y el otro rechazó cirugía, siendo intervenido a los 7 meses por rotura del mismo. Tras comparar la captación con zonas de mayor estrés, en todos los pacientes coincidieron ambas. En los dos pacientes con rotura del aneurisma, la localización de la rotura correspondió a la zona de mayor actividad metabólica detectada por el PET-TC, que a su vez era la de mayor estrés. A pesar del escaso número de pacientes y de la evidente necesidad de estudios poblacionales para confirmar estos hallazgos, los autores concluyeron que, existe una potencial conexión entre un metabolismo acelerado en la pared de aorta aneurismática y un elevado estrés mecánico en la misma. Por otro lado, sugieren que el PET-TC, asociado a un modelo de análisis de elementos finitos puede monitorizar el desarrollo y la evolución de los AAA⁽¹³⁰⁾.

Sin embargo Kotze, en 2011, realizó un estudio para intentar correlacionar el metabolismo aumentado en la pared de aorta aneurismática con la expansión del AAA, realizando un seguimiento de 12 meses mediante ecografía dúplex. Para ello, se realizó de forma prospectiva un PET-TC con 18-FDG a 34 pacientes diagnosticados, de los cuales 9 de ellos no pudieron cumplir un correcto seguimiento, por lo que finalmente fueron 25 pacientes los que pudieron ser evaluados. El tiempo entre la inyección y la realización de la prueba fue de 180 minutos. El análisis de la captación se realizó mediante SUVmax en la zona de mayor captación de la pared aórtica y mediante la TBR (target of background ratio), en este caso el cociente entre la SUVmax y dividido por el ROI de la sangre de la vena cava inferior. La SUVmax media en

el AAA de la serie fue de 1,7 y el TBR medio fue de 1,15. La media de expansión del AAA fue de 2 mm anual, y se halló una correlación inversa de -0,5 entre la SUVmax y la expansión anual del AAA, por lo que los autores concluyeron que en su serie los AAA con menor actividad metabólica tienden a presentar mayor crecimiento, teoría que contradecía la hipótesis planteada inicialmente por Sakalihan⁽¹³¹⁾.

Marini, en 2012, continuó en la misma línea que Kotze, En un estudio con 12 pacientes con AAA en torno a 50 mm de diámetro se les realizó un PET-TC, así como a un grupo control de otros 12 pacientes. El tiempo entre la inyección del 18-FDG y la realización de la prueba fue de 60-90 minutos. El análisis de la captación se realizó mediante el TBR. Los pacientes fueron intervenidos, y durante la cirugía, se obtuvieron fragmentos de pared aórtica aneurismática de cada paciente, dividiéndose cada uno de los fragmentos en tres porciones. La primera porción se congeló y posteriormente se cultivó con 2-3 MBq de FDG durante 5 minutos. Otra de las porciones se incubó con la misma solución con el trazador y posteriormente congelado. En la tercera porción se registraron imágenes autoradiográficas, junto con estudios inmunohistoquímicos de densidad celular, síntesis y tipo de ADN. Los autores no hallaron captación en ningún paciente ni del grupo de AAA ni en el grupo control. La inmunohistoquímica mostró una alteración severa de la estructura de la pared aneurismática. La retención del trazador se correlacionó con un incremento de la densidad celular con mayor prevalencia de células sintetizadoras de DNA. Por tanto, los autores concluyen que la pérdida de la estructura de la pared y baja densidad celular que conlleva justifican la baja

presencia de captación de 18-FDG en pacientes con AAA cercanos al rango quirúrgico⁽¹³²⁾.

Dada la ausencia de captación en la mayoría de los pacientes del anterior estudio, el mismo grupo (Palombo, 2012) presentó un estudio comparativo caso-control entre un grupo de 40 pacientes con AAA (diámetro medio de 49 mm) frente a un grupo control de 44 pacientes con diámetro aórtico normal y sin evidencia de enfermedad aterosclerótica. Se realizó en ambos grupos un PET-TC, el tiempo de adquisición fue de al menos 60 minutos tras la inyección del radiotrazador. Se realizó un análisis tanto visual como cuantitativo, mediante el TBR. También se estimó la cantidad total de calcio en diversos segmentos arteriales. Ningún paciente mostró incremento focal de captación a nivel de la pared aneurismática. Incluso, la actividad metabólica en la zona aneurismática es incluso menor, de forma estadísticamente significativa, que en zonas de aorta no aneurismática (en los pacientes del grupo AAA), así como también es menor que en los pacientes del grupo control. No se observó correlación entre el grado de captación y el diámetro aórtico, aunque una de las posibles limitaciones del estudio es el diámetro medio de los AAA, por debajo de los 50 mm. Los autores concluyen que la captación de 18-FDG por el PET-TC es extremadamente infrecuente en AAA con diámetros al límite del rango quirúrgico⁽¹³³⁾.

Entre las posibles explicaciones a estas diferencias entre diversos estudios, un parámetro importante en el diseño de los diversos estudios podría ser el tiempo de circulación del 18-FDG, es decir, el tiempo que se espera desde la inyección del radiotrazador y la realización del PET-TC. Sin embargo, se ha demostrado en un estudio prospectivo que el tiempo de circulación mayor

de 60 minutos, extendido incluso hasta los 180 minutos, no influye en los resultados en cuanto a captación de la pared aórtica, significando sin embargo una prolongada espera que resulta incómoda para el paciente⁽¹³⁴⁾. Sin embargo, este estudio se realizó en pacientes con aterosclerosis, no con AAA, por lo que pudiera ser que en este grupo de pacientes el tiempo de espera pudiera influir en los resultados.

Otro trabajo que puso en duda la capacidad de captación de 18-FDG mediante el PET-TC para valorar un incremento de la actividad metabólica en la pared aneurismática fue el publicado por Tegler en 2012. En un estudio prospectivo llevado a cabo con 12 pacientes con AAA, 7 de ellos en rango quirúrgico que precisaron intervención, y otros 5 con un tamaño entre 34-40 mm, en seguimiento. Todos los casos eran asintomáticos, y ninguno de ellos había presentado un crecimiento reciente (≥ 5 mm en 6 meses o 10 mm en 12 meses). Se excluyeron pacientes diabéticos (para no interferir con el FDG), y aquellos no aptos para cirugía abierta. Por otro lado se obtuvo un grupo control de 13 pacientes sin AAA. A todos se les realizó un PET-TC, con un tiempo de espera de 60 minutos tras la inyección del trazador. Se realizó un análisis visual de las imágenes, así como un análisis de la captación mediante SUVmax y la SUVmedia. Al grupo de pacientes que fueron intervenidos se les extrajo una pieza de pared aórtica aneurismática de la zona de captación positiva, así como otra de la cara anterior de la aorta. En caso de no captación, sólo se extrajo la segunda muestra. Las piezas fueron fijadas y procesadas para su examen histológico. Se cuantificaron parámetros inflamatorios como anticuerpos frente a linfocitos (CD3), así como linfocitos T (CD4 y CD8) y macrófagos. No se detectó captación aumentada en ninguno de las zonas

aneurismáticas del grupo de AAA, ni en los intervenidos ni en los que estaban en seguimiento, comparado con segmentos no dilatados de aorta, ni de hígado ni de sangre (por lo que todas las muestras se obtuvieron de pared anterior). Tampoco hubo diferencias con respecto a la captación con el grupo control. El examen histológico de la pared aneurismática demostró un infiltrado inflamatorio incrementado con linfocitos T, B y macrófagos. El estudio concluye que dicho proceso inflamatorio en la pared de los AAA asintomáticos no presenta una actividad metabólica suficiente como para ser captada con el 18-FDG, planteando la posibilidad de realizar nuevos estudios con diferentes marcadores⁽¹³⁵⁾. Como todos los estudios previos, la muestra es pequeña. Sin embargo, dado que ninguno de los pacientes con AAA presentó captación elevada, los autores creen que un estudio con mayor número de casos no hubiera cambiado las conclusiones.

Ante la disparidad de los resultados obtenidos en los diversos estudios expuestos previamente, algunos autores plantearon la posibilidad de la detección y cuantificación de la captación del 18-FDG en la pared aneurismática se viera dificultada por efectos de volumen parcial. Para ello, Reeps publicó en 2013 un trabajo en el que se diseñó y validó un nuevo *software* basado en el IDL (Lenguaje interactivo de Datos), para la corrección y precisión del análisis cuantitativo del 18-FDG, y poder correlacionarla con la histopatología y la presentación clínica de los AAA. Para ello se realizó un PET-TC a 23 pacientes con AAA (sintomáticos y asintomáticos) antes de la cirugía, en la que se extrajo una muestra de pared aórtica aneurismática. Se determinó una corrección del volumen parcial tanto en las áreas con mayor captación (SUVmax y SUVmedia) como en las que no captaban. Los

resultados se intentaron correlacionar con la presentación clínica, así como la expresión de MMP-2 y MMP-9 e infiltrado de macrófagos en la pieza quirúrgica. En cuanto a la clínica de los pacientes, Tanto la SUVmax como la SUVmedia como la corrección de ambas mostraron una diferencia significativamente estadística entre pacientes sintomáticos y asintomáticos. Las SUVs corregidas y no corregidas presentaron diferencias en cuanto la correlación con el infiltrado de macrófagos y expresión de MMP-9. No hubo correlación entre captación y MMP-2. Los autores concluyeron, por tanto, que la corrección del volumen parcial no es necesaria para una valoración cuantitativa del metabolismo de la glucosa en la pared aneurismática, aunque puede ser necesaria para establecer niveles de corte para plantear qué pacientes requieren una intervención quirúrgica⁽¹³⁶⁾.

En 2013, Courtois, conjuntamente con Sakalihan, publicaron un trabajo en el que se insistía en la correlación entre la captación de 18-FDG mediante PET-TC y las alteraciones celulares y moleculares que conllevan al deterioro de la pared aneurismática y su posterior expansión y rotura⁽⁷⁶⁾. En él se incluyeron 18 pacientes con AAA diagnosticado previamente. 3 pacientes eran sintomáticos, y 4 pacientes habían experimentado un crecimiento rápido. Tras la realización del PET-TC (tiempo de espera tras la inyección de 60 minutos), se dividió a los pacientes en función de la captación del 18-FDG. En este estudio se realizó en primer lugar una valoración visual, y posteriormente se analizó la SUVmax, y fundamentalmente la SUVr con respecto al hígado (ratio entre la SUVmax a nivel del AAA y la SUVmax a nivel del hígado). Se prefirió este parámetro que se consideró más fiable que la SUVmax, debido a que los autores consideraron que las SUVs pueden variar en función del

dispositivo y de los protocolos, y se escogió la ratio con respecto al hígado debido a la baja variabilidad entre pacientes⁽¹³⁷⁾. Según la captación del 18-FDG, se dividieron los pacientes en dos grupos. En el primer grupo, donde no hubo captación significativa, se incluyeron 10 pacientes (PET0). En el segundo grupo (PET+), se incluyeron los 8 pacientes que presentaron captación aumentada. Durante la intervención quirúrgica se extrajeron muestras de pared aneurismática. En el grupo PET0, se obtuvo un fragmento de la cara anterior del aneurisma. En el grupo PET+, un fragmento se obtuvo de la zona de mayor captación utilizando para ello marcas anatómicas del TC, y el otro de un lugar de no captación y a suficiente distancia del anterior. Un fragmento de cada muestra se fijó para análisis histológicos e inmunohistoquímicos. Del resto de muestra se separó la media de la adventicia, y se congelaron para análisis zimográficos y transcriptómicos. La actividad metabólica en la pared aneurismática expresada mediante SUVr fue significativamente más elevada en pacientes del grupo PET+ (SUVr media de 1) con respecto al grupo PET0 (SUVr media de 0.49). En el grupo PET+, las muestras se caracterizaban por una gran proliferación de células inflamatorias adventiciales, y por una marcada reducción de las CMLs en la media en comparación con las del grupo PET0. La expresión de una serie de genes involucrados en el mantenimiento y remodelación de la pared, tales como MMP-12, MMP-15, TIMP-2, RECK (*reversión-inducing-cysteine-rich proteína with kazal motifs*) y EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*) estaban significativamente disminuidas en las zonas sin captación del grupo PET+, en comparación con las del grupo PET0, sugiriendo una alteración global de la pared aneurismática. La adventicia de las zonas sin captación del grupo PET+ también era

claramente diferente a la del grupo PET0, debido a una reducción en la expresión del TNF- α y del TGF- β , el cual mantiene la supervivencia de las CMLs, por lo que esta reducción pudiera contribuir a la debilidad de la pared aneurismática, como se ha demostrado previamente⁽¹³⁸⁾. Además, en las muestras de zonas de mayor captación, existe un importante incremento de las MMPs, especialmente de las MMP1 y MMP-13, sobre todo en la adventicia. Por otro lado, en los pacientes del grupo PET+ se apreció un mayor volumen de PCR circulante. Por tanto, los autores concluían que la elevada captación de 18-FDG la pared aneurismática se asocia a un activo proceso inflamatorio que se caracteriza por un denso infiltrado de leucocitos que proliferan en la adventicia, así como a una elevación de la PCR circulante. Además, la pérdida de CMLs en la media, y la alteración en la expresión de determinados genes involucrados en la remodelación de la adventicia y en la degradación del colágeno, pueden ser partícipes del debilitamiento de la pared aneurismática que precede a la rotura.

Para intentar de nuevo correlacionar la actividad metabólica en la pared aneurismática captada por el PET-TC y las propiedades biomecánicas de la pared que derivan en estrés de la misma y posterior rotura, Nchimi, en 2014, incluyó 53 pacientes con patología aneurismática (47 AAA, 3 AAT y 3 AATA) a los que se les hubiera realizado al menos un PET-TC en un período de 5 años. SE realizaron entre 1 y 5 estudios en este período, resultando un total de 68 exámenes, con un tiempo medio entre los mismos de 7.2 meses. En función del seguimiento clínico y radiológico, se definieron diferentes eventos clínicos: crecimiento del AAA de >10 mm por año, disección, rotura o cirugía urgente. El tiempo de adquisición del trazador fue de 60 minutos, y el análisis de las

imágenes se realizó mediante SUVmax, SUVrl (ratio con respecto a hígado) y SUV rv (ratio con respecto retorno venoso). Posteriormente se obtuvo una simulación con elementos finitos para calcular valores de estrés de la pared. La geometría de estas áreas se confirmó mediante TC para excluir los fallos en la reconstrucción, como anatomías complejas, elongaciones, bifurcaciones, etc. Durante el período del primer mes, se registraron de forma significativa más eventos clínicos en aquellos pacientes que en su último examen habían presentado captación aumentada, con respecto a los que no la presentaron. Cuantitativamente, la captación aumentada se correlacionó con los niveles de estrés de la pared, aunque se demostraron más áreas de captación y de estrés en la pared de los aneurismas torácicos, y que dicha captación fue particularmente elevada en pacientes con antecedente de cardiopatía isquémica e historia familiar de aneurisma. Los autores concluyen que la captación del 18-FDG está relacionada con la localización del aneurisma, el estrés de la pared y los factores de riesgo del paciente⁽¹³⁹⁾.

Sin embargo, un reciente estudio publicado por Barwick en 2014, vuelve a poner en duda la utilidad del PET-TC en esta patología, comparando la captación del 18-FDG en una población con AAA frente a un grupo control sin enfermedad aneurismática. Se trata de un estudio retrospectivo, revisando la base de datos de PET-TC en los que se incluyeron los casos que presentaban AAA (151 pacientes, con un diámetro medio de 50 mm), excluyendo cirugía previa del mismo, vasculitis, aneurismas infecciosos y AATA. El grupo control lo formaron 159 pacientes con diámetro >30 mm., sin diferencias entre las características basales de ambos grupos. El período de captación del trazador fue de 90 minutos. Se realizó una primera valoración de la captación visual, y

posteriormente se analizaron las imágenes mediante la SUVmax, y posteriormente también mediante TBR. Se envió un cuestionario a los médicos que realizaron el seguimiento de los pacientes, incluyendo mortalidad, causa de muerte, reparación del AAA y rotura del mismo. No se encontraron diferencias significativas entre el grupo AAA y grupo control en cuanto a captación visual (24% vs 19%), SUV max (1.75 vs 1.84), ni TBR (1.03 vs 1.05). Tras una respuesta del 46% a los cuestionarios enviados, y durante un seguimiento medio de 18 meses, 20 pacientes fueron intervenidos para reparación del AAA (uno de ellos de urgencia) y 4 presentaron rotura del mismo. No hubo diferencias en cuanto a la SUVmax entre los pacientes intervenidos y los no intervenidos. La mitad de los pacientes con rotura del AAA habían presentado captación elevada. A pesar de las limitaciones del estudio, que es retrospectivo y que no precisa muchos datos acerca del seguimiento de los pacientes, el objetivo de este estudio, que presenta un serie larga de pacientes con AAA y un grupo control similar, los autores concluyen que no existen diferencias en cuanto a la captación de 18-FDG por el PET-TC entre AAA y aortas de diámetro normal, y que la actividad metabólica de ambos grupos es muy variable y no se correlaciona con el diámetro aórtico⁽⁷⁵⁾. Sin embargo, y aunque no era el objetivo de este estudio, no se valora la posible correlación de la captación del radiotrazador con el proceso inflamatorio crecimiento del AAA y su potencial rotura.

Según algunos autores, dicha rotura no depende directamente de una regulación del proceso inflamatorio de la pared aórtica, dado que según ellos no existen diferencias en biopsias de pared aneurismática en AAA rotos frente

a las de AAA no rotos en cuanto a parámetros inflamatorios, que incluso pueden estar disminuidos en caso de rotura⁽¹⁴⁰⁾.

Por último, un recentísimo trabajo presentado por Morel en 2015 se plantea una nueva posibilidad: la de la presencia de cambios cíclicos en el metabolismo de la pared aórtica durante el crecimiento del AAA⁽¹⁴¹⁾. En un grupo de 39 pacientes (de los cuales 37 eran varones) con AAA asintomáticos y menores de 55 mm de diámetro (con una media de 46 mm), se les realizó un PET-TC (90 minutos tras la inyección del trazador), y la captación del 18-FDG se realizó mediante la SUVmax. Asimismo se analizaron los factores de riesgo y las características anatómicas del AAA en cuanto a diámetro máximo y volumen en cm³. Posteriormente se realizó un nuevo estudio PET-TC con las mismas características en 9 meses, comparándose con el basal. 9 pacientes (23% de la muestra) presentaron un crecimiento en el diámetro máximo del AAA ($\geq 2,5$ mm) en ese período. En ellos se demostró de manera significativa una menor captación frente a los pacientes que no presentaron crecimiento (SUV max de 1,80 vs 2,21). Además, este grupo presentaba una tendencia a presentar mayor incremento de la SUVmax a los 9 meses (+0,40 vs -0,06, respectivamente). Tras ese período, ambos grupos de pacientes presentaban una captación similar (SUVmax de 2,20 vs 2,15). Los autores concluyen que el aumento del diámetro en los AAA pequeños viene precedido por una fase con una baja captación de 18-FDG, aunque ésta no se observa posteriormente en las fases de crecimiento, lo que sugiere un patrón de cambios metabólicos cíclicos en la pared aneurismática. Por tanto, consideran que el PET-TC no es una herramienta efectiva para predecir las fases de crecimiento de los AAA de pequeño tamaño⁽¹⁴¹⁾. A pesar de que es el único trabajo recogido en la

literatura en el que se realiza un segundo estudio mediante PET-TC, los hallazgos son interesantes y pueden ayudar a explicar los mecanismos fisiopatológicos relacionados con la expansión del AAA. Sin embargo, aún no son concluyentes en cuanto a la utilidad de esta prueba como biomarcador para estratificar el riesgo de rotura y valorar la eficacia de posibles tratamientos farmacológicos.

Dos recientes revisiones sistemáticas remarcan la evidencia contradictoria acerca de la captación de 18-FDG mediante el PET-TAC y su posible relación con las alteraciones en las características moleculares y su posible valor predictor de crecimiento y rotura de los AAA. En el trabajo publicado por Timur ⁽¹⁴²⁾ en 2015, se incluyen los trabajos hasta la fecha acerca de la captación de 18-FDG en AAA focalizados en las características moleculares de la pared aneurismática. Se concluye que aunque en los trabajos publicados se demuestra una alteración en las características moleculares de la misma, no queda demostrado que estos cambios conlleven el aumento de tamaño del AAA y su posterior rotura. Se remarcan la necesidad de incluir un mayor número de pacientes en futuros estudios, así como la necesidad de protocolización de protocolos para valoración y cuantificación de la captación de 18-FDG. Por otro lado, el trabajo publicado por Jalalzadh en 2016 ⁽¹⁴³⁾, que analiza el proceso inflamatorio captado por PET-TAC, confirman la evidencia contradictoria entre dicha captación y el crecimiento y rotura del AAA, confirmando la compleja y aún parcialmente desconocida relación entre el proceso inflamatorio y la progresión del AAA.

Sin embargo, otros autores continúan confiando en el PET –TC para detectar pacientes con AAA en riesgo de expansión, y recientes trabajos

consideran que la heterogenicidad de la señal del TC, correlacionada con la captación aumentada del trazador, pudieran proporcionar información pronóstica en los AAA de pequeño tamaño que permitan estratificar el riesgo de estos pacientes y plantear el momento adecuado para su tratamiento quirúrgico⁽¹⁴⁴⁾⁽¹⁴⁵⁾. Por otro lado, también se está planteando la posibilidad de la utilidad de esta prueba como predictor de endofugas en pacientes con AAA tratados mediante EVAR, ya que la captación aumentada de 18-FDG en estos pacientes pudiera ser un predictor indirecto de un crecimiento continuado del saco aneurismático debido a la presencia de una endofuga (incluso aunque esta no se haya podido demostrar por otros métodos de imagen), con riesgo de expansión y rotura⁽¹⁴⁶⁾. Courtois, del grupo de Sakalihan demostró recientemente la expresión aumentada de determinados genes (fundamentalmente CCL18) en aquellas zonas de mayor captación de 18-FDG, que podría estar relacionada con una potencial progresión del AAA y su potencial rotura⁽¹⁴⁷⁾.

Continúan, por tanto, precisándose nuevos estudios prospectivos, que, según otros autores deberían concentrar sus esfuerzos en la estandarización metodológica para poder establecer comparaciones entre ellos, así como en la posibilidad de valorar otras técnicas de imagen alternativas, como la RMN con nanopartículas susceptibles a macrófagos⁽¹⁴⁸⁾ o USPIO (*ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide*)⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁵⁰⁾, o el mismo PET-TAC con diferentes radionúclidos, como los anticuerpos anti-CD105 marcados con Cu⁶⁴, como propone un trabajo publicado en 2016 por Shi⁽¹⁵¹⁾.

VII.C. Estudios previos de proteómica en AAA

Son pocos los trabajos que han analizado mediante proteómica la pared aórtica aneurismática. El primer artículo publicado que lo hizo fue el trabajo de Urbonavicius en 2009⁽¹⁵²⁾. En este trabajo se estudiaron y compararon los mapas proteómicos de 17 muestras de tejido aórtico aneurismático, 9 de ellas obtenidas durante la reparación electiva de pacientes con aneurisma de aorta abdominal (no rotos) y 8 obtenidas en pacientes intervenidos de forma urgente por aneurisma de aorta roto. Los métodos de obtención y preparación de las muestras fueron similares a los utilizados en el presente estudio. Al comparar los niveles de proteínas entre las muestras de aneurismas rotos y no rotos, encontraron diferencias significativas en los niveles de 7 de ellas, 4 con niveles aumentados en los aneurismas rotos, y las otras 3 presentaban niveles inferiores (los aneurismas no rotos se usaron como referencia).

De las 7 proteínas, 2 no pudieron ser identificadas con claridad. Las 5 proteínas restantes se identificaron como:

- Proteínas aumentadas en los aneurismas rotos: Peroxiredoxina-2 y β -actina (las otras dos proteínas que se encontraban aumentadas en las muestras de aneurisma roto no se pudieron identificar).
- Proteínas disminuidas en los aneurismas rotos: Albúmina, γ -Actina de músculo liso y Vitronectina.

Las peroxiredoxinas son una familia de proteínas antioxidativas capaces de eliminar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a un residuo de

Cisteína que comparten en la región N-terminal⁽¹⁵³⁾. Estas proteínas se han implicado en la defensa celular frente a factores pro-oxidantes y en la regulación de varios procesos intracelulares tales como la proliferación, diferenciación y apoptosis⁽¹⁵³⁾⁽¹⁵⁴⁾. Una sobreexpresión del gen de las peroxiredoxinas confiere a la célula resistencia a niveles elevados de H₂O₂.

El papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y los antioxidantes en la génesis de los aneurismas de aorta es un área de gran interés en el momento actual. Se han identificado niveles elevados de iones superóxido (O₂⁻) en el tejido aórtico aneurismático, en comparación con el tejido de aorta sana adyacente (2.5 veces inferior) y con muestras control de tejido aórtico sano (10 veces inferior)⁽¹⁵⁵⁾. Este ambiente pro-oxidante tiene importantes implicaciones en cuanto a degradación de la matriz extracelular y activación de las MMPs, de forma que es posible que el estrés oxidativo juegue un papel en la patogénesis de los aneurismas de aorta abdominal⁽¹⁵⁵⁾⁽¹⁵⁶⁾. Por lo tanto, según Urbonavicius el aumento de las peroxiredoxinas en las muestras de tejido aneurismático puede ser secundario a mecanismos específicos de respuesta al daño y estrés producido en los aneurismas rotos.

La actina, que también se ha encontrado en este trabajo aumentada en los aneurismas rotos, puede deberse al aumento de la actividad de degradación proteolítica durante la ruptura del aneurisma. La albúmina, sin embargo, que se encuentra disminuida en las muestras de aneurisma roto, puede deber sus niveles a una dilución de sus moléculas debido al edema inflamatorio de la pared aórtica o a una degradación proteolítica aumentada⁽¹⁵²⁾.

La vitronectina, por su parte, es una glicoproteína multifuncional que puede encontrarse en el plasma sanguíneo y en la matriz extracelular, incluyendo la de la pared arterial. Participa en diversas funciones tales como migración, fijación y diferenciación celular, coagulación, fibrinólisis y complemento. Se cree que la actividad aumentada de las metaloproteasas en los aneurismas (sobre todo MMP-9, MMP-2 y MMP-12) puede ser la responsable de la degradación patológica de la vitronectina, explicando sus niveles bajos en las muestras de tejido de aneurisma aórtico roto⁽¹⁵⁷⁾.

Un año más tarde, en 2010, el mismo autor publicó otro trabajo⁽¹⁵⁸⁾ en el que analizaba los mapas proteómicos de muestras de tejido aórtico aneurismático, relacionando los niveles de proteínas encontrados con el tamaño del aneurisma y su tasa de crecimiento, con la idea de buscar marcadores que pudiesen predecir la ruptura de un AAA y así identificar a los pacientes de riesgo. Los autores encontraron seis puntos en el gel con correlación moderada con el tamaño de los aneurismas de los que procedían las muestras, de los cuales pudieron identificar un total de 3 proteínas: vitronectina (con trazas de calreticulina), albúmina y la proteína de unión a la Vitamina D (DBP), las dos primeras con una correlación negativa (menor cantidad de proteína a mayor diámetro del aneurisma) y la última con correlación positiva. Respecto a la tasa de crecimiento de los aneurismas, se identificaron 16 puntos en los mapas proteómicos que guardaban una fuerte correlación con la tasa de crecimiento aneurismático, de los cuales 6 mostraban una correlación positiva, mientras que los 10 restantes tenían una correlación negativa. Los autores fueron capaces de identificar las proteínas correctamente en 9 de los 16 puntos:

- Proteínas identificadas con correlación positiva: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, anexina-A4, fragmento ig-h3 de la proteína inducida por TGF- β y el colágeno α -3(VI).
- Proteínas identificadas con correlación negativa: apolipoproteína H, cadena β del fibrinógeno, un fragmento de albúmina, inmunoglobulina α -1 y apolipoproteína A-I (con trazas de albúmina).

El aumento del fragmento ig-h3 de la proteína inducida por TGF- β hace pensar que la propia TGF- β pueda estar aumentada en los aneurismas. El TGF- β pertenece a familia de péptidos secretores multifuncionales, esencial en el desarrollo y remodelación vascular, con influencia en la proliferación de células musculares lisas, síntesis de matriz extracelular e inflamación intraplaca⁽¹⁵⁹⁾. Esta molécula aumenta la producción del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP), disminuyendo por tanto la inflamación y la expresión de metaloproteinasas. El hecho de que se encuentre aumentado parece ser compensatorio, dada la aumentada actividad proteolítica que existe en los AAA. De todas formas, hay estudios que sugieren que la sobre-expresión de TGF- β 1 puede estar asociada al crecimiento de los AAA⁽¹⁶⁰⁾.

No existe una clara explicación para la correlación negativa encontrada para la cadena β del fibrinógeno, si bien en la bibliografía se ha encontrado asociación positiva entre el tamaño del aneurisma y las concentraciones de fibrinógeno en plasma⁽¹⁶¹⁾. La vitronectina también presenta una correlación

negativa con el tamaño del aneurisma, de acorde con los hallazgos encontrados en su anterior estudio⁽¹⁶²⁾.

En estudios previos al que se está comentando ahora se ha encontrado asociación entre los niveles circulantes del propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III con el tamaño y la tasa de crecimiento de los AAA⁽¹⁶³⁾. En los mapas proteómicos se encontró una relación entre los niveles de fragmentos de colágeno α -3(VI) y el tamaño del aneurisma, así como con su tasa de expansión, lo cual está de acorde con las observaciones de estudios previos.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa presenta también una correlación positiva con la tasa de crecimiento de los aneurismas, la cual se ha publicado que puede estar implicada en la iniciación de la apoptosis y el estrés oxidativo⁽¹⁶³⁾, lo cual a su vez puede estar relacionado con la patogénesis de la enfermedad aneurismática⁽¹⁵⁸⁾. Los autores también encontraron correlación negativa entre la tasa de crecimiento de los aneurismas y los niveles de apolipoproteína H y apolipoproteína A-I. En consonancia con estos datos, se han publicado niveles bajos de colesterol HDL y apolipoproteína A-I en pacientes con AAA respecto a la población general⁽¹⁶⁴⁾.

La proteína de unión a la Vitamina D (DBP) es el principal transportador de la vitamina D y sus metabolitos en plasma. Tiene importantes funciones fisiológicas como el almacenamiento y transporte de la Vitamina D, transporte de ácidos grasos, recogida de actina, activación y quimiotaxis de macrófagos, etc. También se ha visto que esta proteína está implicada en mecanismos de

remodelación vascular, y puede contribuir al papel protector de los esteroides de Vitamina D en el desarrollo de enfermedades vasculares⁽¹⁶⁵⁾.

Esto se corresponde con los hallazgos en los geles de doble electroforesis, dado que se encontró una correlación positiva entre el tamaño de los aneurismas de aorta y los niveles de DBP. De todas maneras, y aunque la DBP era la proteína mayoritaria en el punto de migración del gel, se encontraron trazas de fragmentos de colágeno en el mismo punto, de forma que los investigadores no pudieron establecer cuál de las proteínas había variado en su expresión.

Por último, la presencia de inmunoglobulinas y albúmina en la pared aórtica aneurismática concuerda con el carácter inflamatorio de los aneurismas de aorta abdominal⁽¹⁶⁶⁾.

En el año 2011 se publicó un trabajo⁽¹⁶⁷⁾ en el que se estudiaba el mapa proteómico de tejido aórtico aneurismático, y se comparaba con tejido aórtico sano obtenido de los mismos pacientes, pero de regiones aórticas sanas. Las muestras se obtuvieron de tres pacientes que fueron intervenidos de forma programada por AAA.

Los autores encontraron, teniendo en cuenta los resultados de los geles de los tres pacientes, 495 puntos que se expresaban de forma diferente entre las muestras de aorta aneurismática y el tejido aórtico sano. De estos 495 puntos, sólo 22 puntos se encontraban en común en los tres pacientes, 19 con un nivel de expresión mayor en las muestras de aorta enferma, y 3 con un nivel de expresión proteica menor. De esos 22 puntos los autores sólo consiguieron identificar 3 proteínas, todas ellas aumentadas en la aorta aneurismática:

precursor del complemento C4-A, el precursor de la cadena α del fibrinógeno y el precursor de la cadena β del fibrinógeno.

Los investigadores dedujeron que los fragmentos de fibrinógeno encontrados, en base a los resultados del análisis proteómico y del estudio inmunohistoquímico⁽¹⁶⁷⁾, se trataban de productos de degradación del fibrinógeno / fibrina, y por ende que la formación de fibrina y la fibrinólisis son fenómenos comunes en el desarrollo de la patología aneurismática.

El trombo mural se puede encontrar en cerca del 75% de los AAA⁽¹⁶⁸⁾, el cual puede producir hipoxia de la capa media de la aorta, induciendo neovascularización e infiltración de la pared arterial por células inflamatorias⁽¹⁶⁹⁾. Además, en los aneurismas de aorta se han descrito cambios histológicos (aterosclerosis y trombosis) en los *vasa vasorum* de la pared arterial⁽¹⁷⁰⁾; de hecho, en el propio estudio que se está comentando ahora, los propios autores encontraron estos cambios histológicos en las muestras de aorta aneurismática⁽¹⁶⁷⁾. Teniendo todo esto en cuenta, incluso cuando no se detecte trombo mural en la pared de un aneurisma de aorta, la coagulación y fibrinólisis que ocurren comúnmente en la media puede dañar las células que componen dicha capa media, contribuyendo a la destrucción de su estructura. Tras encontrar aumentados los niveles del precursor de C-4A, los investigadores quisieron comprobar si el sistema del complemento se encontraba activado en los aneurismas, y para ello buscaron el depósito de C1q (dado que es el componente inicial de la vía clásica en la activación del complemento). En el análisis inmunohistoquímico encontraron depósito de C1q en todas las capas arteriales de las muestras aneurismáticas, mientras que no lo encontraron en el tejido aórtico sano, por lo que el sistema del complemento

se encuentra activado en las regiones de aorta aneurismática. Esto puede dañar a las células de la pared arterial, atacando a sus membranas plasmáticas y produciendo la lisis celular. Recientemente, se ha publicado que el reclutamiento de neutrófilos dependiente de complemento es un paso crítico para el desarrollo de ratones experimentales con AAA inducidos por elastasa⁽¹⁷¹⁾.

Por último, Molacek⁽¹⁷²⁾ ha publicado recientemente sus resultados del estudio proteómico de muestras de tejido aórtico aneurismático. Junto con nuestro estudio constituyen los dos únicos trabajos que han analizado muestras de tejido aórtico aneurismático, comparándolas con muestras de tejido aórtico sano de pacientes sin AAA (donantes de órganos en parada cardiorrespiratoria). El trabajo de Ando⁽¹⁶⁷⁾ también analizó muestras de tejido aórtico sano, pero procedente de regiones aórticas no enfermas de los mismos pacientes de los que procedían las muestras de tejido aneurismático.

En este artículo se estudia la expresión proteómica de 15 muestras de aorta aneurismática y se compara con el de 10 muestras de tejido aórtico sano procedente de donantes de órganos. Los criterios de inclusión y el protocolo de recogida de muestras fue similar al empleado por nosotros. Se identificaron un total de 417 puntos en los geles, de los cuales 314 se expresaban tanto en las muestras de aorta aneurismática como en la aorta sana, pero de forma diferencial. De los puntos con más volumen y mejor definidos se pudieron identificar un total de 22 proteínas:

- Proteínas aumentadas en los AAA: α -1-antitripsina, albúmina, colágeno α -2(VI), endoplasmina, fibrinógeno γ , inmunoglobulina

α -2, inmunoglobulina γ -1, factor 17 de procesamiento de pre-mRNA y transferrina.

- Proteínas disminuidas en los AAA: Actina cardíaca- α , alcohol-deshidrogenasa 1B, anexina A-2, anexina A-5, proteína 1 rica en cisteína y glicina, destrina, enolasa- α , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, proteína de choque térmico de 70 kDa, keratina (tipo II, citoesqueleto 1), transgelina, proteína-glutamina γ -glutamyltransferasa 2 y vimentina.

En este artículo, a diferencia de los estudios previos de proteómica de AAA, los autores no realizaron una interpretación de los resultados obtenidos, dada la cantidad de proteínas con una expresión diferencial que encontraron.

VII.D. Metabolismo energético celular en pared aneurismática

En la literatura son muy pocos los trabajos acerca del metabolismo energético de la pared aneurismática. A diferencia del metabolismo de las células del músculo estriado cardíaco, fundamentalmente a expensas de los ácidos grasos (aunque en determinados procesos patológicos como la insuficiencia cardíaca se ve alterado y hay un aumento de la glucólisis)⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾, en las células del músculo liso de la pared arterial el metabolismo es sobre todo a expensas de la glucólisis aeróbica⁽¹⁷⁵⁾⁽¹⁷⁶⁾. De hecho, la pared arterial se suministra de oxígeno y nutrientes por difusión y convección desde el flujo del interior del vaso, así como de los vasa vasorum de la adventicia y la capa externa de la media.

En los AAA, existe un proceso inflamatorio con infiltrado celular y degradación enzimática de la pared, probablemente relacionado con un

incremento en el metabolismo de la glucosa. Algunos autores consiguieron demostrar un aumento de la expresión de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) no solamente en patología tumoral, sino también en procesos inflamatorios, que presentaban una elevada captación de FDG (superior al músculo sano)⁽¹⁷⁷⁾. La expresión de estas GLUTs puede disminuir significativamente cuando existe una sobrecarga de glucosa, disminuyendo por tanto también la captación del radiotrazador en procesos inflamatorios⁽¹⁷⁸⁾.

Diversos estudios han confirmado la relación inversa entre la presencia de DM y AAA⁽¹⁷⁹⁾. Los cambios que presenta la pared aneurismática, con inflamación y activación de la proteólisis conllevan una pérdida de elastina y otras proteínas estructurales. Sin embargo, la DM se asocia con un aumento de la síntesis de estas proteínas y por tanto menor degradación de la matriz. El depósito de los productos resultantes tras la glicolisis conlleva una mayor resistencia a la proteólisis en los pacientes diabéticos⁽¹⁸⁰⁾.

En un estudio publicado por Ruud en 2009⁽¹⁸¹⁾ para valorar la relación entre la inflamación en la pared arterial y la calcificación, factores de riesgo y biomarcadores, se realizó un PET-TC a 41 pacientes con enfermedad vascular o múltiples factores de riesgo. En esta serie 15 pacientes tenían historia de DM, no existiendo diferencias de captación entre pacientes diabéticos y no diabéticos. Los autores achacaron esta ausencia de diferencia, por un lado, al tratamiento médico de la enfermedad, dado que algunos fármacos antidiabéticos, como las glitazonas, han demostrado efectos antiinflamatorios⁽¹⁸²⁾, por lo que esto podría reducir el grado de inflamación en la pared arterial detectable por el PET-TC. Por otro lado, esta ausencia de

diferencia también podría deberse al efecto competitivo de la hiperglucemia en la captación del 18-FDG.

En el trabajo publicado por Modrego en 2012⁽¹⁸³⁾, se evalúa la expresión de las proteínas relacionadas tanto con el citoesqueleto como con el metabolismo energético en los AAA. Para ello se analizaron 13 muestras de pared aórtica en pacientes intervenidos por AAA y se compararon con 12 muestras de pared aórtica no aneurismática. En las muestras de pacientes con AAA se demostró, por un lado, una disminución de la expresión de triosafosfato isomerasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa y aldehido deshidrogenasa en el citosol. Por otro, se objetivó una disminución de piruvato deshidrogenasa (PDH), con un incremento de lactato y piruvato, a pesar de no haber diferencias en cuanto a la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), lo cual indicaría que en pacientes con AAA, se favorece el metabolismo anaeróbico. En la aorta no aneurismática, el flujo sanguíneo laminar existente, con ausencia de turbulencias y escaso rozamiento con el endotelio, mantiene un equilibrio fisiológico entre los componentes de la sangre y la pared arterial. En pacientes con AAA, los cambios de calibre de la arteria provocan la alteración de este equilibrio y reducen la cantidad de oxígeno en la sangre. Por otro lado, se ha planteado la posibilidad de una menor difusión de oxígeno a la pared por la presencia de trombo intraluminal en las aortas aneurismáticas, que conlleva una hipoxia local. Todo ello iría en consonancia con un estado que favorecería el metabolismo anaerobio⁽¹⁸⁴⁾⁽¹⁸⁵⁾.

Además, en este estudio se demostraron, en el grupo de AAA, niveles disminuidos de determinadas proteínas del citoesqueleto (glicoproteína-4 asociada a microfibrilla isotipo 1, anexina A5 isotipo 1 y anexina A2) en

comparación con el grupo control, y niveles más elevados en la expresión de filamina, favoreciéndose por tanto la degradación de la pared aneurismática. Los autores desconocen si los cambios tanto en las proteínas del citoesqueleto como en las enzimas relacionadas con el metabolismo energético están relacionados entre ellos, pero ambos contribuyen a una mayor distensibilidad de la pared aneurismática, y por tanto a su potencial expansión y rotura⁽¹⁸³⁾.

VII.E. Aportación de nuestro estudio

En resumen, existe una gran controversia con respecto a la utilidad del PET-TC en la valoración del proceso metabólico e inflamatorio de los AAA. Los estudios publicados hasta ahora son muy heterogéneos y se recogen en la tabla 7.1.

Publicación	Número de AAA	Análisis captación	Control	Hallazgos
Sakalihan⁽⁷²⁾ (2002)	15 asintomáticos 11 sintomáticos	Visual	No	Posible asociación entre aumento de captación y expansión y rotura del AAA
Reeps⁽⁷⁴⁾ (2008)	12 asintomáticos 3 sintomáticos	SUVmax	24 pacientes	Aumento de captación en asintomáticos y sobre todo en sintomáticos. Aumento de infiltrado inflamatorio y MMPs
Truijers⁽¹²⁸⁾ (2008)	17	SUVmax	17 pacientes	Aumento de captación frente a grupo control
Kotze⁽¹²⁹⁾ (2009)	14	SUVmax	No	Aumento de captación en AAA, sobre todo en AAAI Aumento de actividad metabólica
Xu⁽¹³⁰⁾ (2009)	2 AAA 2 AATA 1 AAT	SUVmax	No	Aumento de estrés mecánico por alteración metabólica en zonas de captación

Publicación	Número de AAA	Análisis captación	Control	Hallazgos
Kotze ⁽¹³¹⁾ (2011)	25	SUVmax TBR	No	Relación inversa entre captación y expansión del AAA
Marini ⁽¹³²⁾ (2012)	12	TBR	12 pacientes	No aumento de captación en AAA
Palombo ⁽¹³³⁾ (2012)	40	Visual TBR	44	Menor captación en AAA frente a grupo control
Tegler ⁽¹³⁵⁾ (2012)	7 con AAA >5cm asintomáticos 5 AAA <5cm en seguimiento	Visual SUVmax SUVmedia	13 pacientes	Ausencia de captación en el AAA pese a inflamación crónica
Reeps ⁽¹³⁶⁾ (2013)	18 asintomáticos 5 sintomáticos	SUVmax SUVmedia	No	Mayor captación en sintomáticos Mayor infiltrado leucocitos y expresión de MMP-9 en sintomáticos
Courtois ⁽⁷⁶⁾ (2013)	18	Visual SUVmax SUVr	No	Asociación de la captación con aumento de leucocitos en adventicia PCR elevada
Nchimi ⁽¹³⁹⁾ (2013)	47 AAA 6 AAT	Visual SUVmax SUVrl SUVrv	No	Más eventos clínicos en pacientes con captación aumentada
Barwick ⁽⁷⁵⁾ (2014)	151	Visual SUVmax TBR	159 pacientes	No diferencia de captación frente a grupo control Ausencia de correlación entre actividad metabólica y diámetro aórtico
Morel ⁽¹⁴¹⁾ (2015)	39	SUVmax	No	Menor captación inicial en AAA con crecimiento Sin diferencias de captación a los 9 meses

Tabla 7.1: Estudios publicados sobre PET-TC en AAA

Por un lado, sus objetivos son diferentes (presencia de la captación en comparación con aortas no aneurismáticas, correlación con el diámetro aórtico,

con el crecimiento del AAA y potencial rotura, con el proceso inflamatorio de la pared). Además, no hay consenso en la metodología empleada, en la inclusión de pacientes (tamaño de la muestra, AAA sintomáticos o no, AAAI, AAA con crecimiento previo, AAA en rango quirúrgico o de pequeño tamaño, grupo control o no). También hay diferencias con respecto al protocolo de realización del PET-TC y adquisición y análisis de las imágenes obtenidas, como el tiempo de adquisición y método de valoración de la captación (visual, SUVmax, SUVmedia, SUVr, TBR). Por último, tras la realización de la prueba, existen diferentes métodos de valoración para correlación de la captación: seguimiento clínico, comprobación de crecimiento y/o rotura, cirugía para obtención de muestras de pared aneurismática). Por todo ello resulta complicado realizar comparaciones entre todos los estudios y establecer conclusiones en base a ellos.

En nuestro trabajo, decidimos escoger una muestra de pacientes ya diagnosticados de AAA, a los que se les iba a realizar una reparación del mismo, para poder obtener muestras de pared aneurismática. Nos pareció interesante incluir pacientes recién diagnosticados y otros que ya lo habían sido previamente y estaban en seguimiento por no estar en rango quirúrgico, para valorar posibles diferencias en cuanto a la captación del trazador. La muestra no es muy elevada, pero encontramos bastante dificultad para incluir pacientes en el estudio. Por un lado, debían ser pacientes candidatos a cirugía abierta, lo cual cada vez resulta más complicado debido a la tendencia cada vez mayor a realizar la técnica endovascular (EVAR). Por otro lado, se excluían pacientes diabéticos o con insuficiencia renal para evitar problemas con el contraste (salvo que ésta fuera terminal y estuvieran en diálisis). En algunos pacientes

recién diagnosticados de AAA mediante TC y con un diámetro grande (>70 mm) no resulta ético esperar unos días para la realización del PET-TC por lo que no se les pudo realizar la prueba. Algunos casos rechazaron entrar en el estudio y otro fueron excluidos tras objetivarse patología tumoral que obligaba a retrasar la intervención del AAA para tratamiento de la misma, o a cambiar la estrategia quirúrgica (EVAR).

En cuanto al protocolo del PET decidimos un tiempo de adquisición de 60 minutos en función de los estudios previos realizados y por recomendación del Servicio de Medicina Nuclear. La captación se midió de manera visual y sobre todo mediante la SUVmax, ya que era la más comúnmente empleada, estableciendo como positiva una captación ≥ 2.5 en función de estudios previos.

Una vez realizada la prueba, y dependiendo de la presencia o no de captación elevada, dividimos a los pacientes en dos grupos, comparándolos según sus características basales y sobre todo en función de las características del AAA (tamaño, crecimiento, presencia de trombo, AAI). Finalmente, dependiendo de la captación se obtuvieron una o dos muestras durante la cirugía, las cuales fueron analizadas para identificar y cuantificar las proteínas implicadas en el proceso metabólico energético de la pared aneurismática. En los pacientes sin captación, la muestra se obtuvo de la cara anterior del aneurisma. En los pacientes que presentaron una SUVmax ≥ 2.5 , aunque no se puede asegurar completamente que la biopsia se realizara de la zona de mayor captación, se empleó la información anatómica obtenida mediante el TC para que la extracción del fragmento de pared se obtuviera de la misma.

El primer objetivo de nuestro estudio era comprobar si existía captación de 18-FDG mediante PET-TC en pacientes con aneurisma de aorta abdominal, que pudiera corresponder a un aumento de actividad inflamatoria en la pared aneurismática. Algunos estudios no han encontrado un aumento de captación en pacientes con AAA frente al grupo control⁽⁷⁵⁾⁽¹³²⁾⁽¹³³⁾⁽¹³⁵⁾. Diversos autores justifican estos resultados por la desestructuración de la pared aórtica y la baja densidad celular, dado que en su serie los AAA eran de pequeño tamaño⁽¹³²⁾⁽¹³³⁾. En otros casos se consideró que el proceso inflamatorio en la pared de los AAA asintomáticos no presenta una actividad metabólica suficiente como para ser captada con el 18-FDG⁽¹³⁵⁾.

Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados hasta ahora sí que confirman la presencia de captación elevada en pacientes con AAA⁽⁷²⁾⁽¹²⁸⁾⁽¹³⁹⁾⁽¹⁴¹⁾, y muchos de ellos la correlacionan con un proceso inflamatorio por aumento de la actividad metabólica⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁶⁾⁽¹²⁹⁾⁽¹³⁰⁾⁽¹³⁶⁾. En nuestra serie, de los 20 pacientes con AAA, 5 de ellos presentaron una elevada captación de 18-FDG en el PET-TC, definido por una SUVmax >2.5. En las muestras de pared aórtica en zona de captación de esos 5 pacientes se han hallado diferencias en cuanto a determinadas enzimas implicadas en el metabolismo energético (Acil-CoA DH, CPTII y UCP-1), comparadas con las muestras de esos 5 pacientes en zona de no captación sumadas a las de los 15 pacientes restantes. Esto implicaría que determinados AAA presentan en su pared un proceso inflamatorio mediado por una alteración del metabolismo energético en la pared.

El segundo objetivo era intentar correlacionar esa captación con los factores de riesgo cardiovascular o con características del AAA como el

crecimiento o el diámetro del mismo. Entre los dos grupos (captación aumentada y no aumentada) no ha habido diferencias en cuanto a sexo, edad o los factores de riesgo habituales, tabaquismo, HTA, dislipemia, cardiopatía isquémica o insuficiencia renal (los pacientes con DM no se incluyeron en el estudio). Sin embargo, sí existieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento demostrado del AAA, que fue del 80% (4 de 5 pacientes) en el grupo de captación elevada, frente al 20% (3 de 15 pacientes) en el otro grupo. En el resto de pacientes no se puede descartar un crecimiento del mismo, ya que en el momento del diagnóstico el diámetro del AAA era considerado suficiente para intervenir, pero el hecho de que la gran mayoría de los pacientes que presentan incremento de la captación presenten un crecimiento demostrado de al menos 5 mm en el último año sugeriría una alteración metabólica en ellos que es captada por el PET-TC.

La valoración de la captación patológica con respecto al crecimiento del AAA es también controvertida. A pesar de que en el primer trabajo de Sakalihan se planteaba una posible correlación entre hipercaptación y expansión y rotura del AAA⁽⁷²⁾, otros autores como Kotze⁽¹²⁹⁾ sugieren todo lo contrario, ya que en su serie de 25 pacientes los AAA con menor actividad metabólica tienden a presentar mayor crecimiento.

El trabajo más reciente publicado al respecto por Morel plantea la posibilidad de que el metabolismo de la pared aneurismática presente cambios cíclicos durante el crecimiento del AAA. En su serie demostró una menor captación en pacientes que posteriormente presentaron crecimiento frente a los que se mantuvieron estables. Sin embargo, tras repetir el estudio en 9 meses, se igualó la captación entre los pacientes de ambos grupos. Esto indicaría que

el PET-TC no sería un eficaz biomarcador para detectar AAA en las fases iniciales de su rápido crecimiento, ya que la alteración metabólica se haría más evidente en fases ya avanzadas de dicho crecimiento. Sin embargo, harían falta estudios prospectivos con un mayor número de pacientes para poder valorar correctamente la utilidad de esta prueba como biomarcador de expansión y rotura. En nuestro trabajo solamente un paciente presentaba un AAA sintomático, por lo que no se ha podido valorar su posible correlación con la captación patológica.

En cuanto al tamaño del AAA, diversos estudios han intentado correlacionar la captación aumentada con un mayor diámetro del mismo, sin conseguirlo⁽¹²⁸⁾. En nuestra serie el diámetro es menor en pacientes del grupo de captación elevada, aunque la diferencia no es significativa, probablemente por el tamaño muestral. Por tanto, a pesar de los hallazgos en la serie de Sakalihan de 2002, en los que parecía existir correlación entre AAA de mayor tamaño o en fase de expansión⁽⁷²⁾, en nuestra serie el diámetro es menor. Creemos que el hecho de que en el grupo de captación la mayoría de los pacientes estaba en seguimiento por presentar un diámetro menor a 55 mm es determinante en este hallazgo.

Por último, el objetivo más importante de nuestro estudio consistía en determinar las diferencias en la expresión de las principales proteínas implicadas en los diferentes procesos que se desarrollan en el metabolismo energético celular en la pared aneurismática con captación de 18-FDG frente a la pared que no presenta proceso inflamatorio, tanto a nivel del metabolismo anaeróbico como aeróbico, beta-oxidación y fosforilación oxidativa. Existe un aumento del proceso inflamatorio en la pared aneurismática de estos pacientes

derivado de una elevada actividad metabólica. No hemos encontrado diferencias significativas en ambos grupos en cuanto a la expresión de PDH ni de LDH, por lo que no parece que en el grupo de captación este aumento de actividad metabólica sea a expensas del metabolismo anaeróbico. Tampoco el metabolismo aeróbico parece verse alterado en este grupo frente al grupo sin captación, ya que no existen diferencias en la expresión de MDH I y II. Con respecto a la beta-oxidación de los ácidos grasos, generador de acetil-CoA, que a su vez ingresa en el ciclo de Krebs, se han observado una disminución estadísticamente significativa de la expresión tanto de AcilCoA DH como de CPT-II en el grupo de captación aumentada, por lo que en estos pacientes tampoco la beta-oxidación estaría implicada como fuente de energía de la célula.

Sin embargo, donde se han apreciado los hallazgos más interesantes de nuestro estudio ha sido al estudiar los cambios a nivel del proceso de fosforilación oxidativa. En el proceso metabólico de obtención de energía mediante la misma, adquiere gran importancia el complejo ATP sintasa, situado en la cara interna de la membrana interna de las mitocondrias. Su función fundamental es la de sintetizar ATP a partir del ADP, un grupo fosfato y la energía suministrada por un flujo de protones (H^+). Las proteínas desacoplantes (fundamentalmente la UCP-1) se encuentran en la membrana mitocondrial del interior de los mamíferos. Estas proteínas permiten que los protones reingresen en la matriz mitocondrial sin que se capture energía en forma de ATP. La UCP-1 se encarga de activar la oxidación de los ácidos grasos y la producción de calor. Ello se consigue desacoplando el gradiente de protones y generando así calor (termogénesis) en lugar de ATP. En el grupo de

captación elevada en nuestro estudio hemos observado un incremento estadísticamente significativo en la expresión de UCP-1, lo que conllevaría una reentrada de protones en la matriz mitocondrial. Esto sugeriría un desacoplamiento de la cadena de fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP por la mitocondria. Dado que la UCP-1 utilizaría estos protones, la ATP sintasa (que también está disminuida en el grupo de captación aunque sin significación estadística, probablemente por el bajo tamaño muestral) no puede emplearlos para la formación de ATP, disminuyendo la producción del mismo. Esta reducción en la producción de ATP por el aumento de UCP-1 conlleva además la producción de calor en la célula, lo que conllevaría el aumento de actividad inflamatoria observada en los fragmentos de aorta que presentaron una captación patológica de FDG. Por tanto, la célula debería encontrar una fuente de energía adicional (que podrían ser los triglicéridos), ya que no parece utilizar el metabolismo de la glucosa como fuente de energía (ni aerobio ni anaerobio), ni la oxidación de ácidos grasos de cadena larga mediante la beta-oxidación.

En la Fig.7.1 se resumen los diversos procesos implicados en el metabolismo energético celular tal y como se expusieron en la introducción de esta tesis, y las diferencias en la expresión de las enzimas implicadas entre el grupo de captación elevada y el que no la presenta.

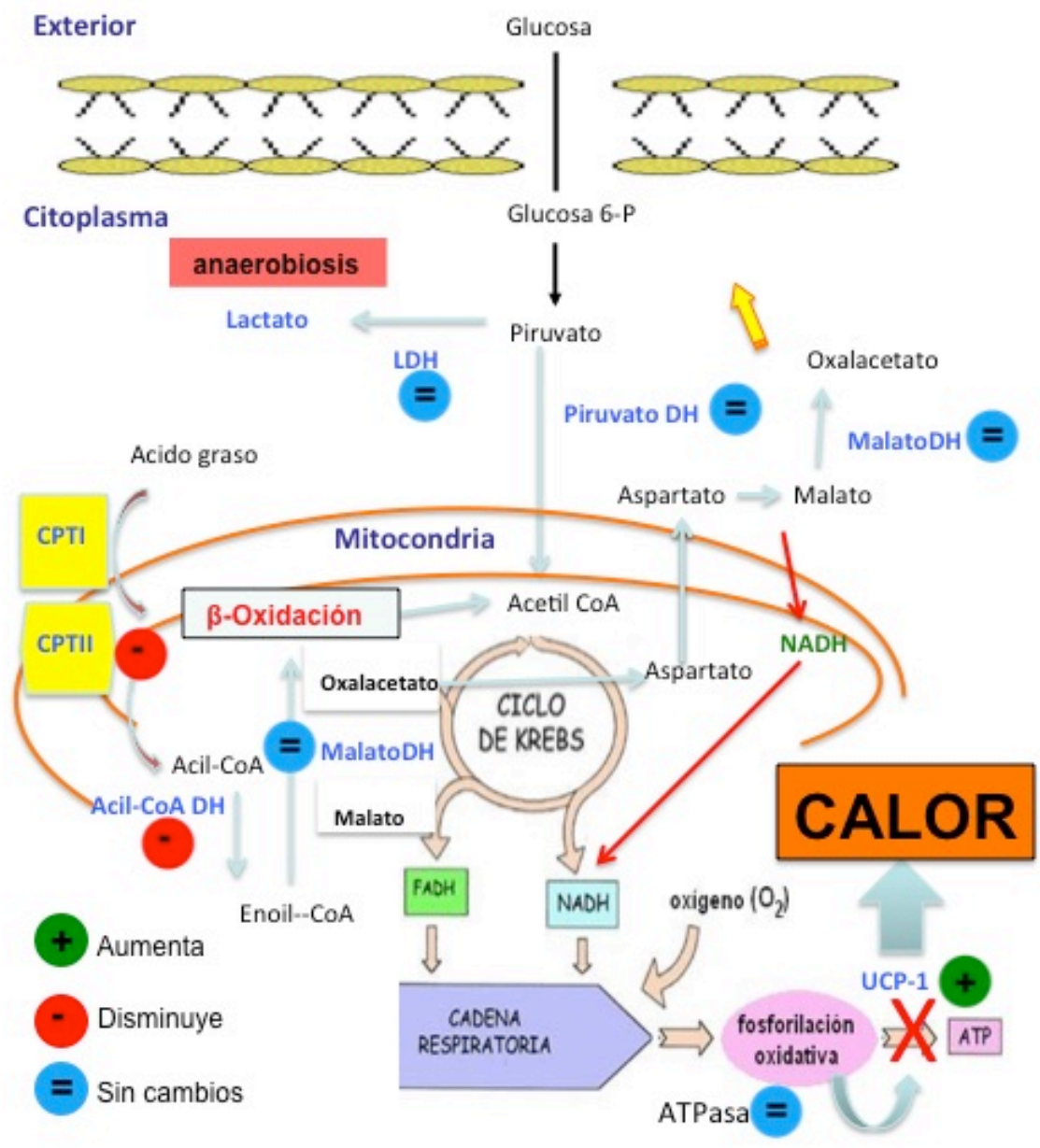


Figura7.1. Esquema representativo del metabolismo energético celular con los procesos implicados: metabolismo anaerobio, aerobio, β-oxidación y fosforilación oxidativa, y las alteraciones enzimáticas detectadas en el grupo con captación elevada, con la disminución de síntesis de ATP y la producción de calor

No hemos encontrado en la literatura ninguna referencia a la alteración del proceso de la fosforilación oxidativa con esta disminución en la síntesis de ATP en pacientes con AAA y aumento en la producción de calor por elevación

de UCP-1. Se desconoce además por qué se produce esta alteración en determinados pacientes, así como la relación de este proceso metabólico con la afectación inmunológica y la susceptibilidad genética. Esto abriría nuevas posibilidades futuras para continuar investigando en esta línea, así como para intentar hallar alguna correlación clínica fundamentalmente encaminada a determinar nuevos biomarcadores de expansión y potencial rotura de los AAA. Por otro lado, también ayudaría a evaluar posibles tratamientos farmacológicos encaminados a frenar el proceso metabólico e inflamatorio que conlleva una desfavorable evolución de esta patología.

VII.F. Limitaciones del estudio

En primer lugar, y como la mayoría de los estudios previos, la muestra de pacientes no es muy elevada, lo cual dificulta la significación estadística de algunos resultados, debido a que encontramos bastante dificultad para incluir pacientes en el estudio. El período de reclutamiento fue de 30 meses, durante el cual solamente 23 pudieron ser inicialmente incluidos, y finalmente 20 de ellos completar todas las fases del estudio. Por un lado, los pacientes debían ser candidatos a cirugía abierta para poder realizar la extracción de muestras. En los últimos años la tendencia a tratar a estos pacientes mediante EVAR ha sido cada vez mayor. Otro motivo es la exclusión de pacientes por factores de riesgo, tales como la DM o la insuficiencia renal. Algunos pacientes rechazaron participar en el estudio. En pacientes recién diagnosticados de AAA mediante TC con contraste, con un tamaño suficientemente grande, se decidió la no inclusión para no retrasar la intervención quirúrgica con la realización de la una nueva prueba. Por último, tres pacientes fueron excluidos tras los hallazgos en

el PET-TC de patología oncológica que obligaba a retrasar la intervención del AAA para tratamiento de la misma, o a cambiar la estrategia quirúrgica (EVAR).

A pesar de ello, y aunque el número de pacientes incluidos nos pareció suficiente como para obtener conclusiones significativas, pensábamos que existiría un mayor número de casos en los que se demostrara una elevada captación. En el momento en que se planteó el estudio, la mayoría de los trabajos publicados daban por hecho que la mayoría de los AAA presentaban una captación de 18-FDG. Sin embargo, los trabajos posteriores ponen en duda no ya solamente este hecho, sino también su correlación con eventos clínicos.

Algo similar nos ocurrió con el protocolo de realización del PET-TC, y sobre todo con el método de análisis y valoración de la captación, que, como se ha descrito previamente, ha sido diferente en los diversos trabajos publicados (visual, SUVmax, SUVmedia, SUVr, TBR). En cuanto al protocolo del PET decidimos un tiempo de adquisición de 60 minutos en función de los estudios previos realizados y por recomendación del Servicio de Medicina Nuclear. La captación se midió de forma visual y mediante SUVmax, decidiéndose emplear esta última finalmente como definitiva, estableciendo como positiva una captación ≥ 2.5 en función de estudios previos. Sin embargo, en algunos trabajos recientes se han empleado otros parámetros como la SUVr con respecto al hígado (ratio entre la SUVmax a nivel del AAA y la SUVmax a nivel del hígado), atribuyéndole mayor fiabilidad que la SUVmax, debido a que los autores consideraron que las SUVs pueden variar en función del dispositivo y de los protocolos, y se escogió la ratio con respecto al hígado debido a la baja variabilidad entre pacientes⁽¹³⁷⁾.

En cuanto a la fiabilidad de la muestra de aorta aneurismática recogida en quirófano, aunque es cierto que no se puede asegurar completamente que la biopsia se realizara de la zona de mayor captación, se empleó la información anatómica obtenida mediante el TC tal y como se ha descrito también en estudios previos, por lo que pensamos que la muestra es representativa para poder evaluar en ella las determinaciones proteicas consideradas relevantes para el estudio.

Por último, la presencia de crecimiento demostrado del AAA, que fue significativamente mayor en el grupo de captación, debe ser matizado. En el resto de pacientes no se puede descartar un crecimiento del mismo, ya que en el momento del diagnóstico el diámetro del AAA era considerado suficiente para intervenir en ese momento y no esperar a su evolución. El hecho de que en el grupo de hipercaptación casi todos los pacientes presentaban un AAA que había crecido implica una alteración inflamatoria y metabólica. Sin embargo, es necesario establecer una correcta relación entre ambos parámetros, ya que los últimos estudios orientan hacia una variación cíclica del proceso inflamatorio en los pacientes con crecimiento del AAA⁽¹⁴¹⁾. Por tanto, se necesitarán más estudios con un número suficiente de pacientes y con objetivos más concretos para poder evaluar la captación de 18-FDG mediante PET-TC como posible biomarcador de crecimiento y potencial rotura del AAA.

VIII. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en la cuantificación de la actividad enzimática de aquellas muestras de tejido aórtico aneurismático en las que se produce aumento de captación de 18-FDG mediante PET-TC, en comparación con los hallados en los controles de pared aneurismática sin aumento de captación, y teniendo en cuenta la bibliografía existente sobre la etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal, podemos establecer a las siguientes conclusiones:

1.- En determinados aneurismas de aorta abdominal existe un incremento de la captación de 18-FDG relacionada con una alteración del metabolismo energético celular, que es detectada por el PET-TC.

2.- Ese aumento de captación no se ha correlacionado en nuestro estudio de manera estadísticamente significativa con edad, sexo o factores de riesgo cardiovascular.

3.- Existe una correlación estadísticamente significativa entre la captación elevada (y por tanto, del proceso inflamatorio y metabólico en la pared aneurismática) y un crecimiento reciente del diámetro del aneurisma aórtico.

4.- En nuestra serie, los aneurismas de aorta abdominal que presentan la mayor captación de glucosa presentaban un menor diámetro, aunque de forma no significativa, probablemente por la asociación previa con el crecimiento demostrado de los mismos.

5.- La alteración del metabolismo energético celular en la pared aórtica con hipercaptación con respecto a la pared sin captación no se correlaciona con

cambios significativos en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo aeróbico ni anaeróbico de la glucosa.

6.- Existe una alteración del metabolismo en la beta-oxidación de ácidos grasos, ya que está disminuida de manera significativa la expresión de enzimas relacionadas con esta vía metabólica. En concreto están reducidas la expresión de Acil-Coenzima A Deshidrogenasa y la carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II) en los aneurismas que presentaron mayor captación de 18-FDG.

7.- Se ha demostrado un aumento significativo en la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP-1 o termogenina) en las muestras de pared aórtica que presentan captación de 18-FDG elevada. Esto sugeriría un desacoplamiento de la cadena de fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP por la mitocondria.

8.- La captación de 18-FDG mediante el PET-TC podría considerarse un potencial biomarcador para detectar aquellos pacientes cuyo aneurisma de aorta abdominal presentan una alteración metabólica que conlleve su crecimiento y riesgo mayor de potencial rotura. Por tanto, podrían identificarse pacientes que se beneficiarían de un tratamiento quirúrgico antes de alcanzar el tamaño que en la actualidad se recomienda para dicha intervención, aunque se necesitarían estudios con mayor número de pacientes y seguimiento a largo plazo para poder comprobar su validez al respecto.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Cronenwett JL, Wayne Johnston K. Rutherford's Vascular Surgery. 7th ed. Philadelphia (EEUU): Saunders Elsevier; 2010.
- 2.- Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. Epidemiol Rev. 1999; 21:207-21.
- 3.- LaMorte WW, Scott TE, Menzoian JO. Racial differences in the incidence of femoral bypass and abdominal aortic aneurysmectomy in Massachusetts: relationship to cardiovascular risk factors. J Vasc Surg. 1995; 21:422-31.
- 4.- Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. J Clin Epidemiol. 1995; 48:1289-98.
- 5.- Scott RA, Gudgeon AM, Ashton HA, Allen DR, Wilson NM. Surgical workload as a consequence of screening for abdominal aortic aneurysm. Br J Surg. 1994; 81:1440-2.
- 6.- Cosford PA, Leng GC. Screening for abdominal aortic aneurysm. Cochrane Database Syst Rev. 2007; 18:CD002945.
- 7.- Minino AM, Arias E, Kochanek KD, Murphy SL, Smith BL. Deaths: final data for 2000. Natl Vital Stat Rep. 2002; 50: 1-119.
- 8.- Bobadilla JL, Kent KC. Screening for abdominal aortic aneurysms. Adv Surg. 2012; 46:101-9.
- 9.- Hallin A, Bergqvist D, Holmberg L. Literature review of surgical management of abdominal aortic aneurysm. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2001;

22: 197-204.

10.- Brady AR, Thompson RW, Greenhalgh RM. Cardiovascular risk factors and abdominal aortic aneurysm expansion: only smoking counts (Abstract). *Br J Surg.* 2003; 90:492.

11.- Schewe CK, Schweikart HP, Hammel G, Spengel FA, Zöllner N, Zoller WG. Influence of selective management on the prognosis and the risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. *Clin Investig.* 1994; 72: 585-91.

12.- Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1994; 20: 529-35.

13.- Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS,. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2003; 37: 1106-17.

14.- Fillinger MF, Marra SP, Raghavan ML, Kennedy FE. Prediction of rupture risk in abdominal aortic aneurysm during observation: wall stress versus diameter. *J Vasc Surg.* 2003; 37: 724-32.

15.- Pasterkamp G, Schoneveld AH, van Wolferen W, Hillen B, Clarijs RJ, Haudenschild CC, Borst C. The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 3057-63

- 16.- Labropoulos N, Zarge J, Mansour MA, Kang SS, Baker WH. Compensatory arterial enlargement is a common pathobiologic response in early atherosclerosis. *Am J Surg.* 1998; 176: 140-3.
- 17.- Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res.* 1969; 25: 667-86.
- 18.- Scherer PW. Flow in axisymmetrical glass model aneurysm. *J Biomech.* 1973; 6: 695-700
- 19.- Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayshahi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation.* 1992; 85: 205-11.
- 20.- Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study. *Circulation.* 2009; 119: 2202-8.
- 21.- Tilson MD, Stansel HC. Differences in results for aneurysms vs occlusive disease after bifurcation grafts: results of 100 elective grafts. *Arch Surg.* 1980; 115: 1173-5
- 22.- Cannon DJ, Casteel L, Reed RC. Abdominal aortic aneurysm, Leryche's syndrome, inguinal herniation, and smoking. *Arch Surg.* 1984; 119: 387-9
- 23.- Lehnert B, Wadouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1992; 6: 134-7.
- 24.- Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Grandrath FA, Glannoukas AD, Lazarides MK. Abdominal aortic aneurysm and abdominal wall hernia as

manifestations of a connective tissue disorder. *J Vasc Surg.* 2011; 54: 1175-81

25.- Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. *Eur J Surg.* 1992; 158: 19-23.

26.- Fowkes FG, Macintyre CC, Ruckley CV. Increasing incidence of aortic aneurysms in England and Wales. *BMJ.* 1989; 298: 33-5.

27.- Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, Krupski WC, Barone GW, Acher CW, Ballard DJ. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med.* 1997; 126: 441-9.

28.- Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 1990; 137: 1199-213

29.- Moñux Ducajú G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003. .

30.- Evans CH, Georgescu HI, Lin CW, Mendelow D, Steed DL, Webster MW. Inducible synthesis of collagenase and other neutral metalloproteinases by cells of aortic origin. *J Surg Res.* 1991; 51: 399-404.

31.- Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, Melas N, Saratzis N, Kitas GD. Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology.* 2011; 62: 18-32.

- 32.- Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 1994; 20: 814-20.
- 33.- Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thomson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1900-10.
- 34.- Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation.* 2001; 104: 304-9.
- 35.- Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H. Identification of matrix metalloproteinases 3 (streptomelisin) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb vasc biol.* 1994; 14: 1315-20.
- 36.- Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1145-51.
- 37.- Aneurysm Consortium. Genome Wide Association Studies: identifying the genes that determine the risk of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;36:395-6.
- 38.- Lindsay ME, Dietz HC. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature.* 2011;473:308-16

- 39.- Bown MJ, Burton PR, Horsburgh T, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. The role of cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a case-control study. *J Vasc Surg.* 2003;37:999-1005.-
- 40.- Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9465-70
- 41.- Rasmussen TE, Hallet JW, Tazellar HD, Miller VM, Schulte S, O'Fallon WM, Weyand CM. Human leukocyte antigen class II immune response genes, female gender, and cigarette smoking as risk and modulating factors in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2002;35:988-93
- 42.- Moñux G, Serrano FJ, Vigil P, De la Concha EG. Role of HLA-DR in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;26:211-4
- 43.- Kuivaniemi H, Kyo Y, Lenk G, Tromp G. Genome-wide approach to finding abdominal aortic aneurysm susceptibility genes in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:270-81
- 44.- Elmore JR, Obmann MA, Kuivaniemi H, Tromp G, Gerhard GS, Franklin DP, Boddy AM, Carey DJ. Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg.* 2009;49:1525-31
- 45.- Helgadóttir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Gretarsdóttir S, Steinthorsdóttir V, Manolescu A, et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet.* 2008;40:217-24

- 46.- Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, et al. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010;42:692-7
- 47.- McPherson R, Pertsemlidids A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science.* 2007;316:1488-91
- 48.- Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Ramey WG, Tilson MD. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1994; 90(5 Pt 2): 11224-7.
- 49.- Hamano K, Li TS, Takahashi M, Kobayashi T, Shirasawa B, Ito H, Zempo N. Enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg.* 2003; 27: 476-80.
- 50.- Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human aortic aneurysm. *Am J Pathol.* 2002; 161: 499-506.
- 51.- Geraghty PJ, Starcher BC, Borhani M, Thompson RW. Interleukin-10 deficiency potentiates aortic collagen and elastin degradation in elastase-induced murine aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21 :676.
- 52.- Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, van Herwaarden JA, Holt PJ, van Keulen JW, Rantner B, Schlösser FJ, Setacci F, Ricco JB; Management of Abdominal Aortic Aneurysms clinical practice

guidelines of the European society for vascular surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2011 ;41 Suppl 1:S1-S58

53.- Brady AR, Thompson S, Fowkes SG, Greenhalgh RM, Powell JT. Abdominal Aortic Aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation*, 2004. 110: 16–21

54.- Becker RC. Emerging paradigms, platforms, and unifying themes in biomarker science. *Journal of the American College of Cardiology* 2007. 50 : 1777–1780

55.- Urbonavicius S, Urbonaviciene G, Honore B, Henneberg EW, Vorum H, Lindholt JS. Potential Circulating Biomarkers for Abdominal Aortic Aneurysm Expansion and Rupture—a Systematic Review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2008.36 : 273–280

56.- Paraskevas KI, Andrikopoulou M, Anastasakis E, Perrea D, Mikhailidis DP. Oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: a possible pathway for the effect of statins? *Angiology* 2010. 61: 226–227

57.- Paraskevas KI, Mikhailidis DP, Veith FJ. 18-F Fluorodeoxyglucose Uptake in Abdominal Aortic Aneurysms: A Useful Biomarker of a AAA Rupture Risk. *Biomed Research International*. 2014. Article ID930738

58.- Phelps ME. PET: the emerging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med* 2000. 41: 661-81.

59.- Hustinx R, Bernard F, Alavi A. Whole-body imaging in the management of patients with cancer. *Semin Nucl Med* 2002. 32: 35-46.

60.- Strauss LG. Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostic of oncological patients. *Eur J Nucl Med* 1996. 23: 1409-15.

- 61.- Zhuang H, Alavi A. 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging in the detection and monitoring of infection and inflammation. *Semin Nucl Med* 2002. 32: 47-59.
- 62.- Belhocine T, Blockmans D, Hustinx R, Vandevivere J, Mortelmans L. Imaging of large vessel vasculitis with (18)FDG PET: illusion or reality? A critical review of the literature data. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003. 30: 1305-13.
- 63.- Wasselius J, Malmstedt J, Kalin B, Larsson S, Sundin A, Hedin U, Jacobson H. High 18F-FDG uptake in synthetic aortic vascular grafts on PET/CT in symptomatic and asymptomatic patients. *J Nucl Med* 2008. 49: 1601-5.
- 64.- Yun M, Yeh D, Araujo LI, Jang S, Newberg A, Alavi A. F-18 FDG uptake in the large arteries: a new observation. *Clin Nucl Med* 2001. 26: 314-9.
- 65.- Yun M, Jang S, Cucchiara A, Newberg A, Alavi A. 18F FDG uptake in the large arteries: a correlation study with the atherogenic risk factors. *Semin Nucl Med* 2002. 32: 70-6.
- 66.- Zhao S, Kuge Y, Tsukamoto E, Mochizuki T, Kato T, Hikosaka K, Nakada K, Hosokawa M, Kohanawa M, Tamaki N. Fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter expression in experimental inflammatory lesions and malignant tumours: effects of insulin and glucose loading. *Nucl Med Commun* 2002. 23: 545-50.
- 67.- Sakalihan N, Michel JB. Functional imaging of atherosclerosis to advance vascular biology. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009. 37: 728–734.
- 68.- Wu Y-W, Kao H-L, Chen M-F, Lee B-C, Tseng WY, Jeng JS, Tzen KY, Yen RF, Huang PJ, Yang WS. Characterization of plaques using 18F-FDG

PET/CT in patients with carotid atherosclerosis and correlation with matrix metalloproteinase- 1. *J Nucl Med* 2007. 48: 227-33.

69.- Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, Bedri S, Vermylen D, Cury RC, Yates D, La Muraglia GM, Furie K, Houser S, Gewirtz H, Muller JE, Brady TJ, Fischman AJ. In vivo ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol* 2006. 48: 1818-24.

70.- Tahara N, Kai H, Ishibashi M, Nakaura H, Kaida H, Baba K, Hayabuchi N, Imaizumi T. Simvastatin attenuates plaque inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2006. 48: 1825-31.

71.- Rudd JH, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, Johnstrom P, Davenport AP, Kirkpatrick PJ, Arch BN, Pickard JD, Weissberg PL. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation* 2002. 105: 2708-11.

72.- Sakalihan N, Van Damme H, Gomez P, Rigo P, Lapiere CM, Nusgens B, Limet R. Positron emission tomography (PET) evaluation of abdominal aortic aneurysm (AAA). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002. 23: 431-6.

73.- Defawe OD, Hustinx R, Defraigne JO, Limet R, Sakalihan N. Distribution of F-18 fluorodeoxyglucose (F-18 FDG) in abdominal aortic aneurysm: high accumulation in macrophages seen on PET imaging and immunohistology. *Clin Nucl Med* 2005. 30: 340-1.

74.- Reeps C, Essler M, Pelisek J, Seidl S, Eckstein HH, Krause BJ. Increased ¹⁸F-fluorodeoxy glucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. *J Vasc Surg* 2008. 48: 417-23.

- 75.- Barwick TD, Lyons OT, Mikhael NG, Waltham M, O'Doherty MJ. 18F-FDG PET-CT uptake is a feature of both normal diameter and aneurysmal aortic wall and is not related to aneurysm size. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014. 41: 2310-2318
- 76.- A. Courtois, B. V. Nusgens, R. Hustinx, Namur G, Gomez P, Somja J, Defraigne JO, Delvenne P, Michel JB, Colige AC, Sakalihan N. 18F-FDG uptake assessed by PET/CT in abdominal aortic aneurysms is associated with cellular and molecular alterations preceding wall deterioration and rupture. *Journal of Nuclear Medicine* 2013. 54: 1740-1747
- 77.- Müller-Esterl W. *Bioquímica, Fundamento para Medicina y Ciencias de la Vida* (1ª edición). Barcelona: Editorial Reverté; 2008 p. 518.
- 78.- Smith C, Marks AD, Lieberman M. *Bioquímica básica de Marks, un enfoque clínico* (2ª edición). Nueva York: McGraw-Hill; 2006. p. 325-330
- 79.- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica* (3ª edición). Filadelfia. Lippincott Williams & Wilkins; 2005. pp. 88-91
- 80.- Devlin T. M. *Bioquímica* (4ª edición). Barcelona: Editorial Reverté, 2004
- 81.- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 1996. 14: 61-5.
- 82.- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975. 250: 4007-21.
- 83.- Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz

GP, Lauridsen JB, Celis JE. Protein-electroblotting and μ -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989. 86: 7701-5.

84.- Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. Arch Biochem 1949. 22: 475.

85.- Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature 2000: 405: 837-46.

86.- Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. Electrophoresis 1997. 18: 533-7.

87.- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol 1999. 19: 1720-30.

88.- Maithal K. Proteomics - a new player in the post-genomic era. Indian J Biochem Biophys 2002. 39: 291-302.

89.- López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. Clin Invest Arterioscl 2008. 20: 164-72.

90.- Boellaard R. Standards for PET image acquisition and quantitative data analysis. J Nucl Med. 2009. 50 Suppl 1: 11S-20S.

91.- Kotze CW, Menezes JL, Endozo R, Groves AM, Ell PJ, Yusuf SW. Increased Metabolic Activity in Abdominal Aortic Aneurysm Detected by ^{18}F -Fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT). Eur J Vasc Endovasc Surg 2009. 38: 93-99

92.- López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, García-Colis E, Gomez J, López-Blaya A, Fortes J et al. Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the

alpha1 -receptor blocker doxazosin. *J Hypertens* 2002; 20: 463-70.

93.- Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Research* 2011; 90: 18-27

94.- Hellenthal FA, Buurman WA, Wodzig WK, Schurink GW. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 464-474.

95.- Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tunon J, Gomez-Guerrero C, Michel JB, Meilhac, Egido J. Proteomics in atherothrombosis: a future perspective. *Expert Rev Proteomics* 2007; 4: 249-260

96.- Lindholt JS, Heickendorff L, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW. Five-year results of elastin and collagen markers as predictive tools in the management of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001; 21: 235-240.

97.- Wallinder J, Bergqvist D, Henriksson AE. Haemostatic markers in patients with abdominal aortic aneurysm and the impact of aneurysm size. *Thromb Res* 2009; 124: 423-426.

98.- Parry DJ, Al-Barjas HS, Chappell L, Rashid T, Ariens RA, Scott DJ. Haemostatic and fibrinolytic factors in men with a small abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2009; 96: 870-877.

99.- Treska V, Topolcan O, Pecan L. Cytokines as plasma markers of abdominal aortic aneurysm. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 1161-1164.

100.- Norman P, Spencer CA, Lawrence-Brown MM, Jamrozik K. C-reactive protein levels and the expansion of screen-detected abdominal aortic

aneurysms in men. *Circulation* 2004; 110: 862-866.

101.- Moris D, Mantonakis E, Avgerinos E. Novel biomarkers of abdominal aortic aneurysm disease: identifying gaps and dispelling misperceptions. *BioMed Research International* 2014, 925840, 13 pag

102.- Greenhalgh RM, Allison DJ, Bell RF et al. Endovascular versus open repair of Abdominal Aortic Aneurysm. *N Engl J Med* 2010; 362:1863-1871.

103.- Martín-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno JA, Vega de Céniga M, Meilhac O, Michel JB, Egido J, Blanco-Colio LM. Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human Abdominal Aortic Aneurysms. *Atherosclerosis*, 2011 Feb;214(2):486-9

104.- Martinez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Calvo E, Camafeita E, Lindholt JS, Meilhac O, Delbosc S, Michel JB, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 935-43

105.-Lindholt JS. Martin-Ventura JL, Urbonavicius S, Ramos-Mozo P, Flyvbjerg A, Egido J, Henneberg EW, Frystyk J. Insulin-like growth factor I -a novel biomarker of Abdominal Aortic Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011; 42: 560-562

106.- Ciborowski M, Teul J, Martin-Ventura JL, Egido J, Barbas C. Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aneurysm based on plasmametabolic fingerprint. *PLoS One*,

2012; 7: 31982

107.- Osman MM, Cohade C, Fishman EK, Wahl RL. Clinically Significant Incidental Findings on the Unenhanced CT Portion of PET/CT Studies: Frequency in 250 Patients. *J Nucl Med* 2005; 46: 1352–1355

108.- Van der Vaart MG, Meerwaldt R, Slart RH, van Dam GM, Tio RA, Zeebregts CJ. Application of PET/SPECT Imaging in Vascular Disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 35: 507-513

109.- Hayashida T, Sueyoshi E, Sakamoto I, Uetani M, Chiba K. PET Features of Aortic Diseases. *AJR* 2010; 195: 229-233

110.- Davies JR, Ruud JH, Fryer TD, Graves MJ, Clark JC, Kirkpatrick PJ. Identification of culprit lesions after transient ischemic attack by combined ¹⁸F Fluorodeoxyglucose positron emission tomography and high-resolution magnetic resonance imaging. *Stroke* 2005; 36: 2642-2647.

111.- Arauz A, Hoyos L, Zenteno M, Mendoza R, Alexanderson E. Carotid plaque inflammation detected by ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose- positron emission tomography pilot study. *Clin Neurol Neurosurg* 2007; 109: 409-412.

112.- Walter MA, Melzer RA, Schindler C, Müller-Brand J, Tyndall A, Nitzsche EU. The value of [¹⁸F]FDG-PET in the diagnosis of large vessel vasculitis and the assessment of activity and extent of disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32: 674-681

113.- Blockmans D, Maes A, Stroobants S, Nuyts J, Bormans G, Knockaert D. New arguments for a vasculitic nature of polymyalgia rheumatica using positron emission tomography. *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38: 444-447.

114.- Blockmans D, Stroobants S, Maes A, Mortelmans L. Positron emission

tomography in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: evidence for inflammation of the aortic arch. *Am J Med* 2000; 108: 246-249.

115.- Iwabu M, Yamamoto Y, Dobashi H, Kameda T, Kittaka K, Nishiyama Y. F-18 FDG PET findings of Takayasu arteritis before and after immunosuppressive therapy. *Clin Nucl Med* 2008; 33: 872-873

116.- Murakami M, Morikage N, Samura M, Yamashita O, Suehiro K, Hamano K. Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography for Diagnosis of Infected Aortic Aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2014; 28: 575-578

117.- Tsai TT, Nienaber CA, Eagle KA. Acute aortic syndromes. *Circulation*. 2005; 112: 3802-3813.

118.- Kato K, Nishio A, Kato N, Usami H, Fujimaki T, Murohara T. Uptake of 18F-FDG in acute aortic dissection: a determinant of unfavorable outcome. *J Nucl Med*. 2010. 51:674-681.

119.- Reeps C, Pelisek J, Bundschuh RA, Gurdan M, Zimmermann A, Ockert S, Dobritz M, Eckstein HH, Essler M. Imaging of Acute and Chronic Aortic Dissection by 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2010; 51: 686-691

120.- Fukuchi K, Ishida Y, Higashi M, Tsunekawa T, Ogino H, Minatoya K. Detection of aortic graft infection by Fluorodeoxyglucose positron emission tomography: comparison with computed tomographic findings. *J Vasc Surg* 2005; 42: 919-925.

121.- Duet M, Laissy JP, Paulmier B, Rossignol P, Bernard F, Ghazzarpiquet N. Inflammatory F-18 Fluorodeoxyglucose uptake over arterial bypass prosthesis seen on positron emission tomography can predict acute vascular events. *J Nucl Cardiol* 2006; 13: 876-879

- 122.- Durham SJ, Steed DL, Moosa HH, Makaroun MS, Webster MW. Probability of rupture of an abdominal aortic aneurysm after unrelated operative procedure: a prospective study. *J Vasc Surg* 1991; 13: 248-252.
- 123.- Bernstein LR, Liotta LA. Molecular mediations of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Opin Oncol* 1994; 6: 106-113.
- 124.- Nahrendorf M, Keliher E, Marinelli B, Leuschner F, Robbins CS, Gerszten RE, Pittet MJ, Swirski FK, Weissleder R.. Detection of macrophages in aortic aneurysms by nanoparticle PET-TC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2011; 31: 750-757
- 125.- Choudhury RP. Macrophage detection in aortic aneurysm. The heat is on. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* . 2011; 31: 723-724.
- 126.- Sarda-Mantel L, Alsac JM, Boisgard R, Hervatin F, Montravers F, Tavitian B, Michel JB, Le Guludec D. Comparison of 18F-fluoro-deoxy-glucose, 18F fluoro- methyl-choline, and 18F-DPA714 for positron-emission tomography imaging of leukocyte accumulation in the aortic wall of experimental abdominal aneurysms. *J Vasc Surg* 2012; 56: 765-773.
- 127.- English SJ , Piert MR, Diaz JA, Gordon D, Ghosh A, D'Alecy LG, Whitesall SE, Sharma AK, DeRoo EP, Watt T, Su G, Henke PK, Eliason JL, Ailawadi G, Upchurch GR Jr. Increased 18F-FDG uptake is predictive of rupture in a novel rat abdominal aortic aneurysm rupture model. *Ann Surg*. 2015; 261: 395-404.
- 128.- Truijers M, Kurvers HA, Bredie SJ, Oyen WJ, Blankensteijn JD. In vivo imaging of abdominal aortic aneurysms: increased FDG uptake suggests inflammation in the aneurysm wall. *J Endovasc Ther*. 2008;15: 462–467.

- 129.- Kotze CW, Menezes LJ, Endozo R, Groves AM, Eil PJ, Yusuf SW. Increased metabolic activity in abdominal aortic aneurysm detected by 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) positron emission tomography/computed tomography (PET/CT). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009; 38: 93-99.
- 130.- Xu XY, Borghi A, Nchimi A, Leung J, Gomez P, Cheng Z, Defraigne JO, Sakalihan N. High levels of 18F-FDG uptake in aortic aneurysm wall are associated with high wall stress. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010; 39: 295-301.
- 131.- Kotze CW, Groves AM, Menezes LJ, Harvey R, Endozo R, Kayani IA, Eil PJ, Yusuf SW. What is the relationship between (1)(8)F-FDG aortic aneurysm uptake on PET/CT and future growth rate? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011; 38: 1493-9.
- 132.- Marini C, Morbelli S, Armonino R, Spinella G, Riondato M, Massollo M, Sarocchi F, Pane B, Augeri C, Abete L, Ghigliotti G, Palmieri D, Fiz F, Cittadini G, Fulcheri E, Palombo D, Sambuceti G. . Direct relationship between cell density and FDG uptake in asymptomatic aortic aneurysm close to surgical threshold: an in vivo and in vitro study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2012; 39: 91-101.
- 133.- Palombo D, Morbelli S, Spinella G, Pane B, Marini C, Rousas N, Massollo M, Cittadini G, Camellino D, Sambuceti G. A Positron Emission Tomography/Computed Tomography (PET/CT) Evaluation of Asymptomatic Abdominal Aortic Aneurysms: Another Point of View. *Ann Vasc Surg* 2012; 26: 491-499
- 134.- Menezes LJ, Kotze CW, Hutton BF, Endozo R, Dickson JC, Cullum I, Yusuf SW, Eil PJ, Groves AM. Vascular inflammation imaging with 18F-FDG

PET/CT: when to image? J Nucl Med 2009; 50: 854-857.

135.- Tegler G, Ericson K, Sorensen J, Bjorck M, Wanhainen A. Inflammation in the walls of asymptomatic abdominal aortic aneurysms is not associated with increased metabolic activity detectable by 18-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography. J Vasc Surg. 2012; 56: 802-807.

136.- Reeps C, Bundschuh RA, Pellisek J, Herz M, van Marwick S, Schwaiger M, Eckstein HH, Nekolla SG, Essler M. . Quantitative assessment of glucose metabolism in the vessel wall of abdominal aortic aneurysms: correlation with histology and role of partial volume correction. Int J Cardiovasc Imaging. 2013; 29: 505-512.

137- Paquet N, Albert A, Foidart J, Hustinx R. Within-patient variability of 18F-FDG: standardized uptake values in normal tissues. J Nucl Med. 2004; 45: 784-788.

138.- Dai J, Losy F, Guinault AM. Over expression of transforming growth factorbeta1 stabilizes already-formed aortic aneurysms: a first approach to induction of functional healing by endovascular gene therapy. Circulation. 2005; 112: 1008-1015.

139.- Nchimi A, Cheramy-Bien JP, Gasser TC, Namur G, Gomez P, Seidel L, Albert A, Defraigne JO, Labropoulos N, Sakalihan, N. Multifactorial Relationship Between 18F-fluoro-deoxy-glucose Positron Emission Tomography Signaling and Biomechanical Properties in Unruptured Aortic Aneurysms. Circ Cardiovasc Imaging. 2014; 7: 82–91.

140.- Wilson WR, Wills J, Furness PN, Loftus IM, Thompson MM. Abdominal Aortic Aneurysm Rupture is not Associated with an Up-regulation of Inflammation within the Aneurysm Wall Eur J Vasc Endovasc Surg 2010; 40,

191-195

141.- Morel O, Mandry D, Micard E. Evidence of cyclic changes in the metabolism of abdominal aortic aneurysms during growth phases: 18F-FDG PET sequential observational study. *J Nucl Med.* 2015;56:1030-1035.

142.- Timur UT, Van Herwaarden JA, Mihajlovic D, De Jong P, Mali W, Moll FL. 18F-FDG PET scanning of abdominal aortic aneurysms and correlation with molecular characteristics: a systematic review. *EJNMMI Research* 2015; 5:76

143.- Jalalzadeh H, Indrakusuma R, Planken RN, Legemate DA, Koelemay MJW, Balm R. Inflammation as a Predictor of Abdominal Aortic Aneurysm Growth and Rupture: A Systematic Review of Imaging Biomarkers *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016; 52, 333-342

144.- Rajani NK, Joshi NV, Elkhawad M, Melville A, Chowdhury M, Ganeshan B, Boyle J, Newby DE, Rudd JH. CT textural analysis of abdominal aortic aneurysms as a biomarker for aneurysm growth. *The Lancet* 2014; 383: S87

145.- Kotze CW, Rudd JH, Ganeshan B, Menezes LJ, Brookes J, Agu O, Yusuf SW, Groves AM. CT signal heterogeneity of abdominal aortic aneurysm as a possible predictive biomarker for expansion. *Atherosclerosis* 2014; 233: 510-517

146.- Paraskevas KI, Tzovaras AA, Stathopoulos V, Gentimi F, Mikhailidis DP. Increased Fluorodeoxyglucose Uptake Following Endovascular Abdominal Aortic Aneurysm Repair: A Predictor of Endoleak? *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 2010; 4: 117-119

147.- Courtois A, Nusgens BV, Hustinx R, Namur G, Gomez P, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Colige AC, Sakalihasan N. Gene Expression Study in Positron

Emission Tomography–Positive Abdominal Aortic Aneurysms Identifies CCL18 as a Potential Biomarker for Rupture Risk *Mol Med* 2014; 20:697-706

148.- Ruud JH, Coughlin PA, Groves AM. Predicting aortic aneurysm expansion by PET. *J Nucl Med* 2015; 56: 971-974

149.- McBride OMB, Joshi NV, Robson JMJ, MacGillivray TJ, Gray CD, Fletcher AM, Dweck MR, Van Beek EJ, Rudd JHF, Newby DE, Semple SI. Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging of Cellular Inflammation in Patients with Abdominal Aortic Aneurysms *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016; 51, 518-526

150.- Jakub J, Meadows JL, Sadeghi MM. Novel Molecular Imaging Approaches to Abdominal Aortic Aneurysm Risk Stratification. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2016 Jan; 9(1): e003023

151.- Shi S, Orbay H, Yang Y, Graves SA, Nayak TR, Hong H, Hernandez R, Luo H, Goel S, Theuer CP, Nickles RJ, Cai W. PET Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm with ⁶⁴Cu-Labeled Anti-CD105 Antibody Fab Fragment. *J Nucl Med* 2015; 56(6)

152.- Urbonavicius S, Lindholt JS, Vorum H, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Honoré B. Proteomic identification of differentially expressed proteins in aortic wall of patients with ruptured and nonruptured aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2009; 49: 455-463.

153.- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*. 1998; 273: 6297-6302.

154.- Kim H, Lee TH, Park ES, Suh JM, Park SJ, Chung HK, et al. Role of

peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem.* 2000; 275: 18266-18270.

155.- Miller FJ, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 560-565.

156.- Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 4322-4326.

157.- Mai K, Shikata H, Okada Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett.* 1995; 369: 249-251.

158.- Urbonavicius S, Lindholt JS, Delbosc S, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Vorum H, Meilhac O, Honoré B. Proteins associated with the size and expansion rate of the abdominal aortic aneurysm wall as identified by proteomic analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010; 11: 433-441.

159.- Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol.* 2005; 14: 28-36.

160.- Fukui D, Miyagawa S, Soeda J, Tanaka K, Urayama H, Kawasaki S. Overexpression of transforming growth factor beta1 in smooth muscle cells of human abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003; 25: 540-545.

161.- Al-Barjas HS, Ariëns R, Grant P, Scott J. Raised plasma fibrinogen concentration in patients with abdominal aortic aneurysm. *Angiology.* 2006; 57: 607-614.

- 162.- Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997; 25: 909-915.
- 163.- Dastoor Z, Drever JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci.* 2001; 114: 1643-1653.
- 164.- Simoni G, Gianotti A, Ardia A, Baiardi A, Galleano R, Civalleri D. Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: lipid parameters. *Cardiovasc Surg.* 1996; 4: 445-448.
- 165.- Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of Vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol.* 2004; 22: 340-345.
- 166.- Lindholt JS, Stovring J, Ostergaard L, Urbonavicius S, Henneberg EW, Honoré B, Vorum H. Serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* outer membrane protein cross-react with the heavy chain of immunoglobulin in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2004; 109: 2097-2102.
- 167.- Ando T, Nagai K, Chikada M, Okamoto K, Kurokawa M, Kobayashi T, Kato T, Makuuchi H. Proteomic analyses of aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2011; 52: 545-555.
- 168.- Harter JP, Gross BH, Callen PW, Barth RA. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. *J Ultrasound Med.* 1982; 1: 315-318.
- 169.- Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, Webster MW. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic

aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg.* 2011; 34: 291-299.

170.- Chütte HE. Changes in the vasa vasorum of the atherosclerotic aortic wall. *Angiologica.* 1968; 5: 210-222.

171.- Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambris JD, Arkinson JP, Thompson RW, Hourcade DE, Pham CT. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Circulation.* 2009; 119: 1805-1813.

172.- Molacek J, Mares J, Treska V, Houdek K, Baxa J. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surg Today.* 2014; 44: 142-151.

173.- Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiol Rev* 2005; 85: 1093-1129

174.- Laskowski KR, Russell RR. Uncoupling Proteins in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2008 ; 5: 75-79.

175.- Paul RJ. Smooth muscle energetics. *Annu Rev Physiol* 1989; 51:331-49.

176- Morrison AD, Berwick L, Orci L, Winegrad AI. Morphology and metabolism of an aortic intima-media preparation in which an intact endothelium is preserved. *J Clin Invest* 1976; 57: 650-660.

177.- Mochizuki T, Tsukamoto E, Kuge Y, Kanegae K, Zhao S, Hikosaka K, Hosokawa M, Kohanawa M, Tamaki N. FDG uptake and glucose transporter subtype expression in experimental tumor and inflammation models. *J Nucl Med* 2001; 42:1551-1555.

178.- Zhao S, Kuge Y, Tsukamoto E, Mochizuki T, Kato T, Hikosaka K, Nakada K, Hosokawa M, Kohanawa M, Tamaki N. Fluorodeoxyglucose uptake and glucose transporter expression in experimental inflammatory lesions and malignant tumours: effects of insulin and glucose loading. *Nucl Med Commun* 2002; 23: 545-550.

179.- De Rango P, Farchioni L, B. Fiorucci, Lenti M. Diabetes and abdominal aortic aneurysms *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014 Mar;47:243-61

180.- Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect Tissue Res* 2007;48:125-131

181.- Rudd JH1, Myers KS, Bansilal S, Machac J, Woodward M, Fuster V, Farkouh ME, Fayad ZA. Relationships among regional arterial inflammation, calcification, risk factors, and biomarkers: a prospective fluorodeoxyglucose positron-emission tomography/computed tomography imaging study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2009; 2: 107-115

182.- Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, Lassila M, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ. Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:1903-1909.

183.- Modrego J, López-Farré AJ, Martínez-López I, Muela M, Macaya C, Serrano FJ, MD, Moñux G. Expression of cytoskeleton and energetic metabolism-related proteins at human abdominal aortic aneurysm sites. *J Vasc Surg* 2012; 55:1124-1133

184.- Bogren HG, Mohiaddin RH, Yang GZ, Kilner PJ, Firmin DN. Magnetic

resonance velocity vector mapping of blood flow in thoracic aortic aneurysms and grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:704-714.

185.- Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroum MS, Nemoto EM, Ogawa S, Webster MW. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurisma with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg* 2001;34: 291-299.

