

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto de la homeostasis y funcionalidad mitocondrial en el  
aneurisma de aorta abdominal y su modificación mediante la  
inhibición del factor XA por rivaroxabán**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Maday Cabrero Fernández**

Directores

**Guillermo Moñux Ducajú**  
**José Javier Zamorano León**  
**Francisco Javier Serrano Hernando**

Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTO DE LA HOMEOSTASIS Y FUNCIONALIDAD  
MITOCONDRIAL EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL Y  
SU MODIFICACIÓN MEDIANTE LA INHIBICIÓN DEL FACTOR XA  
POR RIVAROXABÁN.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

MADAY CABRERO FERNÁNDEZ

DIRECTORES

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ  
JOSE JAVIER ZAMORANO LEÓN  
FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MÉDICO – QUIRÚRGICAS



**TESIS DOCTORAL**

**EFFECTO DE LA HOMEOSTASIS Y FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL  
EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL Y SU MODIFICACIÓN  
MEDIANTE LA INHIBICIÓN DEL FACTOR XA POR RIVAROXABÁN.**

MADAY CABRERO FERNÁNDEZ

DIRECTORES DE TESIS

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

JOSÉ JAVIER ZAMORANO LEÓN

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

MADRID, 2022





La presente tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores Guillermo Moñux Ducajú, José Javier Zamorano León y Francisco Javier Serrano Hernando y financiada por la beca del programa de Biomedicina 2017 de la Comunidad de Madrid a través del proyecto GenObIA-CM (Proyecto S2017/BDM-3773) y cofinanciado por los Fondos estructurales de la Unión Europea (Fondos FEDER) y Bayer Pharmaceuticals.



*A mis padres, a mi hermano y a mis abuelos, por su educación, su apoyo y su cariño, a los que debo todo lo que soy.*

*A Enrique, mi compañero de viaje, mi amor, mi amigo, el padre de nuestra preciosa niña, al que quiero y admiro, por sus consejos, su amor y su ayuda.*

*Al Profesor Antonio José López Farré, que en paz descanse, eminente científico, ejemplar persona, trabajador innato, por ser el cerebro de esta y muchas otras tesis.*



## ***Agradecimientos.***

*Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a que yo haya llegado a donde estoy y que esté optando a la categoría de doctora.*

*Con especial cariño quiero recordar al Dr. Antonio López Farré, sin él esta tesis doctoral no hubiese sido posible. Agradezco mucho haber conocido a tan eminente científico que, pese a su ajetreada agenda, nunca te negaba un hueco para compartir sus extraordinarios conocimientos y lo hacía con una sonrisa y con un trato cercano y cariñoso. ¡Ojalá Leo sepa lo extraordinario que era su abuelo!*

*Agradecer a mis directores y tutor. Al Dr. Serrano, "El Jefe", por mi formación como cirujana vascular, por enseñarme que no hay enemigo fácil. Al Dr. Zamorano por su trabajo en el análisis de las muestras y por ayudarme siempre con todas mis dudas y con la revisión de mi tesis, incluso antes de ser mi director siempre ha estado a mi lado en esta "aventura". Al Dr. Moñux, a Willy, por adentrarme en el mundo de la investigación e impulsarme a comenzar con mi doctorado, pero sobre todo por tratarme siempre con cariño y confiar en mi, por eso hoy eres mi director, mi jefe y también mi amigo. A mi tutor, el Dr. Reguillo, por acogerme sin dudar, guiarme en la escritura de la tesis y estar siempre pendiente por si algo me faltaba. A Begoña, por hacer siempre fácil las citas con Antonio y los distintos trámites, por soportar siempre a doctorandos y directores. A todos y cada uno de los miembros del laboratorio, por su trabajo diario.*

*A mis profesores de colegio, instituto y universidad, porque sin su formación y su paciencia diaria, ninguno llegaríamos donde estamos. A mi tía Vanesa, mi madrina, por la cantidad de horas que ha dedicado a resolver siempre mis dudas en el instituto.*

*A todo el servicio de Cirugía Vasculardel Clínico por darme una formación brillante. A Ángel Galindo por su buen humor, por luchar por enseñarnos, por confiar en mi en todas nuestras guardias de los martes; a Teresa Reina por ser un ejemplo de mujer fuerte, por ser como una madre, por dejarme operar mi primera aorta; y, por supuesto a Rodrigo Rial, el cirujano más elegante, la persona a la que siempre podía acudir por temas personales o profesionales, por dejarme mi primera carótida, mi primer distal y por hacerme creer en mi. A Lola y a Píluca por hacer nuestro día a día más fácil. A mis residentes mayores y pequeños, compañeros y amigos, en especial a Pablo Marqués porque además de ser extraordinariamente brillante ha sido mi guía, mi confidente y mi apoyo.*

*A mis padres, Pilar y Alfonso, por permitirme una formación excelente, por enseñarme los valores de la constancia y el trabajo duro, por educarme con todo el amor del mundo, por ser como son, porque vivan siempre tan ilusionados y con tanta energía. A mi hermano Sergio, por tener la paciencia de soportarme cuando tenía exámenes y ser cómplice de mis juegos, porque siempre seamos una familia unida. A mi abuela Pili, que ha cuidado de mi desde que era un bebé, por ser la persona más bonita que conozco, porque su vida la dedica a cuidar y ayudar al resto. A mi abuelo Gregorio, que ojalá estuviera aquí para ver donde he llegado y sobre todo para conocer a su bisnieta, por su fortaleza frente a las enfermedades y a las adversidades, por sus ganas de vivir, por hacer siempre piña, por sus migas, sus cangrejos y sus torrijas, por los días de fútbol, excusa para reunirnos con sus almendras, boquerones y tortillas de patata. A mis tías, tíos, primas y primos, por tener una*

*familia maravillosa con la que la vida es más fácil y divertida. A todas mis amigas, me siento afortunada de teneros, en especial a Guadalupe, por estar a mi lado en todos los momentos de mi vida, sobre todo en los difíciles en los que miras alrededor y quedan muy pocas personas.*

*A mi marido, Enrique, al destino que quiso que nos conociéramos, por todos los autobuses y taxis que ha cogido para sustituirme o venir a "tirar de valva"; por corregir mi tesis en sus ratos libres y ver "en bucle" mi presentación; por el cirujano apasionado que es y por intentar transmitirme y enseñarme todo lo que puede; por hacerme reír a diario y hacer mi vida más divertida; por estar siempre a mi lado y enseñarme a creer en mí; por hacerme madre; por cambiarme la vida y por todo lo que nos queda por vivir... porque cada día estemos más enamorados.*

*A Julia, mi niña, que con solo unos meses ya me ha enseñado que existe el amor infinito, porque me hace querer ser mejor persona para poder ser su ejemplo. Porque en su embarazo se gestó por fin la escritura de esta tesis. Ojalá pueda transmitirte los valores necesarios para ser una mujer fuerte, decidida, luchadora y feliz, muy feliz, y porque tenga la fortuna de vivirlo a tu lado.*

*Gracias a todos, sin vosotros no hubiese sido posible.*



---

# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>I. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>1.</b>
1. TABLAS .....	3.
2. FIGURAS .....	4.
<b>II. ABREVIATURAS</b>	<b>9.</b>
<b>III. RESUMEN</b>	<b>15.</b>
1. RESUMEN EN ESPAÑOL .....	17.
2. RESUMEN EN INGLÉS ( <i>SUMMARY</i> ) .....	21.
<b>IV. INTRODUCCIÓN</b>	<b>25.</b>
1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL .....	27.
1.1. Definición y clasificación .....	27.
1.2. Prevalencia .....	28.
1.3. Factores de riesgo .....	29.
1.4. Historia natural .....	30.
1.5. Anatomía patológica de la aorta sana y aneurismática .....	31.
1.5.1. Aorta sana .....	31.
1.5.2. Aorta aneurismática .....	33.
1.6. Diagnóstico .....	36.
1.6.1. Presentación clínica .....	36.
1.6.2. Diagnóstico por imagen .....	36.
1.6.2.1. Ecografía abdominal .....	36.
1.6.2.2. Tomografía computarizada con contraste .....	37.
1.6.2.3. Resonancia magnética nuclear .....	39.
1.6.2.4. Tomografía computarizada por emisión de positrones .....	40.

1.6.3. Marcadores bioquímicos.....	40.
1.7. Cribado .....	41.
1.8. Seguimiento del aneurisma de aorta abdominal de pequeño tamaño.....	42.
1.8.1. Intervalos de seguimiento.....	42.
1.8.2. Tratamiento médico para reducir el crecimiento del aneurisma de aorta abdominal.....	43.
1.8.3. Tratamiento médico para reducir el riesgo cardiovascular.....	43.
1.9. Tratamiento.....	44.
1.9.1. La decisión de tratar quirúrgicamente.....	44.
1.9.2. Elección del tipo de tratamiento quirúrgico.....	45.
2. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.....	47.
2.1. Teoría aterosclerótica.....	47.
2.2. Teoría mecánica.....	49.
2.3. Teoría actual.....	50.
2.3.1. Aumento de la proteólisis: degradación de la matriz extracelular.....	53.
2.3.2. Aumento de la apoptosis de células musculares lisas.....	55.
2.3.3. Aumento del infiltrado inflamatorio.....	56.
2.3.4. Papel del estrés oxidativo en el aneurisma de aorta abdominal.....	59.
2.3.5. Papel del trombo intraluminal en el aneurisma de aorta abdominal.....	60.
3. HEMOSTASIA, FIBRINOLISIS, FACTOR XA Y RIVAROXABÁN.....	63.
3.1. Hemostasia.....	63.
3.1.1. Vasoconstricción refleja.....	63.
3.1.2. Hemostasia primaria.....	63.
3.1.3. Hemostasia secundaria.....	64.

3.2. Fibrinólisis.....	65.
3.3. Factor Xa y sus funciones en la pared vascular.....	66.
3.4. Hemostasia, fibrinólisis y FXa en el aneurisma de aorta abdominal.....	68.
3.5. Rivaroxabán.....	68.
3.5.1. Descripción y mecanismo de acción.....	68.
3.5.2. Farmacocinética.....	68.
3.5.3. Indicaciones terapéuticas.....	69.
4. BIOGÉNESIS, FUNCIONALIDAD Y DINÁMICA MITOCONDRIAL.....	70.
4.1. La mitocondria como organela celular.....	70.
4.2. Mitofagia.....	71.
4.3. Biogénesis mitocondrial.....	73.
4.4. Fusión y fisión mitocondrial.....	74.
4.5. Homeostasis mitocondrial.....	76.
4.6. Disfunción mitocondrial en la enfermedad aneurismática.....	76.
<b>V. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....</b>	<b>81.</b>
<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	<b>85.</b>
1. OBJETIVO GENERAL.....	87.
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	87.
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>89.</b>
1. SELECCIÓN DE PACIENTES.....	91.
1.1. Pacientes con aneurisma de aorta abdominal.....	91.
1.2. Grupo control.....	91.
2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA.....	92.
3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	92.

---

3.1. Protocolo de incubación y diseño experimental.....	92.
4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS DETERMINACIONES	
MOLECULARES REALIZADAS.....	95.
4.1. Medición del contenido en ADN.....	95.
4.2. Determinaciones de actividad enzimática de la citrato sintasa y	
la citocromo C oxidasa.....	95.
4.2.1. Material empleado.....	95.
4.2.2. Preparación de las muestras.....	96.
4.2.3. Análisis.....	97.
4.3. Aislamiento de extractos mitocondriales y citosólicos.....	99.
4.4. Determinación de las proteínas Drp1 mediante Western Blot.....	100.
4.4.1. Material empleado.....	101.
4.4.2. Preparación de las muestras.....	102.
4.4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida vertical en condiciones	
desnaturalizantes.....	104.
4.4.4. Transferencia (blotting) y bloqueo de las proteínas.....	105.
4.4.5. Cuantificación de expresión de proteínas.....	105.
4.4.6. Análisis densitométrico de expresión proteica.....	106.
4.5. Determinación de la interacción PINK1-parkin mitocondrial por dot-blot.....	107.
4.5.1. Material empleado.....	107.
4.5.2. Preparación de las muestras.....	108.
4.5.3. Técnica de determinación.....	108.
4.5.4. Análisis.....	108.
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	110.

6. ASPECTOS ÉTICOS .....	110.
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	<b>113.</b>
1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA.....	115.
2. CONTENIDO EN ADN.....	116.
3. ACTIVIDAD DE LA CITRATO SINTASA Y CITOCROMO C OXIDASA.....	117.
4. EXPRESIÓN DE DRP1.....	121.
5. INTERACCIÓN PINK1-PARKIN.....	122.
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	<b>125.</b>
1. ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL.....	127.
1.1. Expresión de enzimas relacionadas con la funcionalidad mitocondrial en el aneurisma de aorta abdominal.....	130.
1.2. Expresión de Drp1, como marcador de fisión, en el aneurisma de aorta abdominal.....	133.
1.3. Expresión de proteínas relacionadas con la mitofagia en el aneurisma de aorta abdominal.....	135.
2. COAGULACIÓN Y FACTOR XA EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL. EFECTOS DEL RIVAROXABÁN SOBRE LA PARED ANEURISMÁTICA.....	139.
2.1. Efecto del rivaroxabán en la homeostasis y funcionalidad mitocondrial.....	142.
3. LIMITACIONES, FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN Y COMENTARIOS FINALES.....	142.
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	<b>147.</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>151.</b>

<b>XII. ANEXOS</b>	<b>179.</b>
1.PUBLICACIONES.....	181.
2.PRESENTACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS.....	182.

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



## I. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

### 1. TABLAS.

- Tabla 1 Pág. 30.  
Tasas estimadas de crecimiento y rotura del aneurisma de aorta abdominal en varones y mujeres (IC del 95%) con aneurismas de pequeño tamaño.
- Tabla 2 Pág. 42.  
Subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos observados en muestras de AAA humanos y en los tres tipos de modelos de animales experimentales.
- Tabla 3 Pág. 93.  
Composición del medio RPMI de cultivo utilizado.
- Tabla 4 Pág. 103.  
Composición del tampón Laemmli.
- Tabla 5 Pág. 115.  
Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes (AAA) y donantes (control) incluidos.
- Tabla 6 Pág. 116.  
Contenido en ADN en muestras de aneurisma de aorta abdominal frente a controles.
- Tabla 7 Pág. 117.  
Contenido en ADN en muestras de aneurisma de aorta abdominal (AAA) y de AAA + rivaroxabán.
- Tabla 8 Pág. 120.  
Análisis de correlación Rho-Spearman entre el diámetro aórtico y la actividad enzimática observada de la citrato sintasa y de la citocromo C oxidasa.

## 2. FIGURAS.

- Figura 1 Pág. 27.  
Reconstrucción tridimensional de un aneurisma de aorta abdominal.
- Figura 2 Pág. 28.  
Clasificación de los aneurismas.
- Figura 3 Pág. 32.  
Esquema representativo de la estructura aórtica normal.
- Figura 4 Pág. 34.  
Anatomía patológica del aneurisma de aorta abdominal (AAA).
- Figura 5 Pág. 35.  
Esquema representativo de la estructura aórtica en un aneurisma de aorta abdominal.
- Figura 6 Pág. 37.  
Imagen ecográfica abdominal en modo B de un aneurisma de aorta abdominal de pequeño tamaño.
- Figura 7 Pág. 36.  
Imagen de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) por angioTC.
- Figura 8 Pág. 37.  
Corte axial de un aneurisma de aorta abdominal roto (AAAR) por angioTC.
- Figura 9 Pág. 37.  
Imagen de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) e ilíacas comunes por angio-RMN (corte coronal).
- Figura 10 Pág. 40.  
Imagen de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) por PET-TC (corte axial).

- Figura 11 Pág. 42.  
Protocolo de seguimiento en pacientes con aneurisma de aorta abdominal (AAA) fusiformes asintomáticos.
- Figura 12 Pág. 46.  
Esquema de reparación quirúrgica de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) mediante cirugía abierta (CA).
- Figura 13 Pág. 46.  
Esquema de la reparación endovascular de un aneurisma de aorta abdominal (AAA).
- Figura 14 Pág. 52.  
Esquema que ilustra la etiopatogenia del aneurisma de aorta abdominal (AAA) y las posibles relaciones entre los distintos mecanismos implicados.
- Figura 15 Pág. 64.  
Esquema de la cascada de la coagulación o hemostasia secundaria.
- Figura 16 Pág. 66.  
Esquema de la fibrinólisis.
- Figura 17 Pág. 70.  
Esquema de la estructura mitocondrial.
- Figura 18 Pág. 73.  
Esquema de la mitofagia.
- Figura 19 Pág. 75.  
Procesos de fisión y fusión mitocondrial.
- Figura 20 Pág. 94.  
Resumen esquemático del diseño experimental.

- Figura 21 Pág. 97.  
Reacción catalizada por la enzima citrato sintasa.
- Figura 22 Pág. 98.  
Reacción catalizada por la enzima citocromo C oxidasa o complejo IV de la cadena transportadora de electrones.
- Figura 23 Pág. 100.  
Esquema de la técnica de Western-blot o inmunoblot.
- Figura 24 Pág. 103.  
Esquema que muestra la desnaturalización de las proteínas.
- Figura 25 Pág. 104.  
Electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes.
- Figura 26. Pág. 107.  
Esquema de la inmunodetección por métodos quimioluminiscentes.
- Figura 27 Pág. 118.  
Actividad de la citrato sintasa en aortas sanas (control) (n = 6) y en muestras de aneurisma de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubadas en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán.
- Figura 28 Pág. 119.  
Actividad de la citocromo C oxidasa mitocondrial en aortas sanas (n = 6) y en el aneurisma de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubadas en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán.
- Figura 29 Pág. 121.  
Representación gráfica entre el diámetro aórtico en el aneurisma de aorta abdominal (AAA) y la actividad enzimática de la citrato sintasa.

- Figura 30 Pág. 122.  
Western blot representativo del contenido de Drp1 mitocondrial (mDrp1) y Drp1 citosólico fosforilado (c-DRP1-P) en Ser637 en segmentos aórticos control (n = 6) y en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubados en presencia y en ausencia de 50 nmol / L del inhibidor de factor FXa, rivaroxabán (Riva).
- Figura 31 Pág. 123.  
Western-blot representativo del contenido de Parkin mitocondrial y Dot-blot de la interacción PINK1 - Parkin en la fracción mitocondrial de los segmentos aórticos del grupo control (n = 6) y en la pared aórtica de aneurismas de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubados en presencia y ausencia de 50 nmol / L del inhibidor del factor de coagulación Xa, rivaroxabán (Riva).



# ABREVIATURAS



## II. ABREVIATURAS

- AAA: Aneurisma de aorta abdominal.
- AAAR: Aneurisma de aorta abdominal roto.
- ADNmt: ADN mitocondrial.
- AngioTC: Tomografía computarizada con contraste.
- ApoE<sup>-/-</sup>: Ratón con deficiencia en la apolipoproteína E.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- BCA: Ácido bicinconínico.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- CA: Cirugía Abierta.
- CML: Células musculares lisas.
- COX: Citocromo C oxidasa.
- Drp1: Del inglés *dynamin-related protein 1*.
- EDTA: Ácido etilendiaminatetraacético.
- ETEV: Enfermedad tromboembólica venosa.
- EVAR: Del inglés *Endovascular Aneurysm Repair*.
- FT: Factor tisular.
- FXa: Factor X activado.
- HRP: Del inglés *Horseradish peroxidase*.
- HTA: Hipertensión arterial.
- IL: Interleucina.
- IMM: Del inglés *inner mitochondrial membrane*.
- IMS: Del inglés *intermembrane space*.
- iNOS: Óxido nítrico sintasa.

- MEC: Matriz extracelular.
- Mdivi1: Del inglés *mitochondrial division inhibitor*.
- Mfn 1 y 2: Mitofusina 1 y 2.
- MMP: Metaloproteasas.
- NK: Natural Killer.
- NO: Óxido nítrico.
- NRF 1 y 2: Factores respiratorios nucleares 1 y 2.
- OMM: Del inglés *outer mitochondrial membrane*.
- OPA1: Proteína relacionada con la atrofia óptica 1.
- OR: Odds ratio.
- PAR: Receptor activado por proteasas.
- PBS: Del inglés *phosphate-buffered saline*.
- PCG1 $\alpha$ : Coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma 1 alpha.
- PET-TC: Tomografía computarizada por emisión de positrones.
- PINK1: Kinasa putativa inducida por PTEN.
- PMN: Polimorfonucleares.
- PMSF: Fluoruro de fenil metil sulfonil.
- PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas.
- PVDF: polifluoruro de vinilideno.
- RL: Radicales libres.
- RMN: Resonancia Magnética Nuclear.
- ROS: Del inglés *reactive oxygen species*.
- RPMI: Se refiere al medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*.

- SDS: Dodecilsulfato sódico.
- SVS / ISCVS: Sociedad de Cirugía Vascul ar y Sociedad Internacional de Cirugía Cardiovascular.
- TBS-T: Del inglés *Tris-Buffered Saline Tween-20*.
- TFAM: Factor A de transcripción mitocondrial.
- TIL: Trombo intraluminal.
- TIM: Del inglés *translocase of inner membrane*.
- TIMP: Del inglés *tissue inhibitors of MMP*.
- TFAM: Factor A de transcripción mitocondrial.
- TGF- $\beta$ : Del inglés *transforming growth factor-beta*.
- TOM: Del inglés *translocase of outer membrane*.
- T-PA: Activador de plasminógeno tipo tisular.
- Tris: Tris-hidroximetil-aminometano.
- TxA2: Tromboxano A2.
- UA: Unidades arbitrarias (densitométricas).
- UCP-2: Del inglés *mitochondrial uncoupling proteins 2*.
- U-PA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa.
- VEGF: Del inglés *vascular endothelial growth factor*.



# III

---

*"Tu propósito te apunta a la dirección correcta,  
pero tu pasión será la que te impulse."*

*Travis McAshan*

# RESUMEN



### **III. RESUMEN.**

#### **1. RESUMEN EN ESPAÑOL.**

**Efecto de la homeostasis y funcionalidad mitocondrial en el aneurisma de aorta abdominal y su modificación mediante la inhibición del factor Xa por rivaroxabán.**

#### **INTRODUCCIÓN:**

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es la decimoquinta causa de muerte en occidente. Pese a ello, no existe en la actualidad ningún tratamiento médico eficaz capaz de evitar su aparición o frenar su crecimiento.

Para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas se precisa de un conocimiento detallado de la patogenia de la enfermedad. En esta patogenia del AAA están implicados la degradación proteolítica de la matriz extracelular, la apoptosis de las células de músculo liso, la inflamación y el estrés oxidativo. No obstante, no se conocen aún los mecanismos celulares y moleculares específicos que están implicados en la formación, progresión y rotura del AAA.

Las mitocondrias son organelas esenciales en el metabolismo energético celular y una importante fuente de estrés oxidativo. Estudios recientes han sugerido la implicación de la función mitocondrial en enfermedades cardiovasculares, incluyendo el AAA.

El factor X activado (FXa) presenta efectos pro-inflamatorios y proteolíticos en la pared vascular que son independientes de la activación de la protrombina. Además, el FXa es capaz de modificar la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y el metabolismo energético. Esta actividad podría estar mediada, al menos en parte, por alteraciones del

metabolismo mitocondrial.

La presencia de trombo intraluminal (TIL), se ha visto asociada a la progresión y rotura del AAA. Se han observado en este TIL niveles aumentados de FXa, por la activación plaquetaria y de la coagulación / fibrinólisis. Esto conlleva una exposición crónica de la pared vascular a dicho factor. Estudios recientes han demostrado que el FXa puede jugar un papel patogénico en el desarrollo y progresión de la enfermedad aneurismática y que su inhibición selectiva mediante rivaroxabán reduce la inflamación, el estrés oxidativo, la anaerobiosis y el remodelado aórtico en estudios in vitro de AAA humanos.

#### **OBJETIVOS:**

Determinar el posible papel de la función y homeostasis mitocondrial en la patogénesis de los AAA. Analizar si la inhibición del FXa endógeno mediante rivaroxabán puede modular la función mitocondrial y la expresión de proteínas asociadas a la dinámica mitocondrial y a la mitofagia en aneurismas humanos.

#### **MATERIAL Y MÉTODOS:**

Se tomaron muestras de tejido aneurismático de pacientes sometidos a cirugía abierta electiva de su AAA (n = 6) y muestras de control de donantes de órganos fallecidos por traumatismo craneoencefálico (n = 6). Las muestras fueron incubadas en medio RPMI tras ser lavadas para retirar los restos de sangre, grasa y trombo.

Se determinó la actividad enzimática de la citrato sintasa (biomarcador de densidad mitocondrial funcionante) y de la citocromo C oxidasa (marcador de función de la cadena

respiratoria mitocondrial) mediante kits colorimétricos basados en su función. La expresión de la proteína Drp1 (marcador de fisión mitocondrial) fue analizada mediante Western Blot y la expresión de parkin y la interacción de PINK1-parkin en la mitocondria (marcadores de mitofagia) mediante dot-blot. Se analizó el efecto del FXa mediante incubación in vitro de los fragmentos aneurismáticos en presencia de 50 nmol/L de rivaroxabán.

## **RESULTADOS:**

La actividad enzimática de la citrato sintasa y de la citocromo C oxidasa se encontraron significativamente reducidas en el AAA con respecto a la aorta sana (actividad de la citrato sintasa en mU/min/mg de proteína: control:  $3.51 \pm 0.22$  vs. AAA:  $0.37 \pm 0.15$ ;  $P < 0.01$ ; actividad de la citocromo C oxidasa en mOD/min/mg de proteína: control:  $8.05 \pm 1.57$  vs. AAA:  $3.29 \pm 1.05$ ;  $P < 0.05$ ). Se objetivó una correlación negativa entre el diámetro aórtico y la actividad de la citrato sintasa (coeficiente Rho: 0.9;  $P < 0.001$ ).

La expresión mitocondrial de la proteína Drp1 fue mayor en las muestras aneurismáticas ( $1126 \pm 174$  UA) que en las muestras de control ( $663 \pm 85$  UA;  $P < 0.05$ ).

La expresión de parkin y la interacción de la PINK1-parkin en la mitocondria se encontraron significativamente reducidas en el AAA (parkin:  $355.625 \pm 74.96$  UA; interacción PINK1-parkin:  $974 \pm 92.16$  UA;  $P < 0.05$ ), respecto a las aortas de control (parkin:  $805.833 \pm 115.32$  UA; interacción PINK1-parkin:  $2082.2 \pm 387.13$  UA;  $P < 0.05$ ).

La incubación con rivaroxabán de las muestras aneurismáticas modificó de forma significativa todos estos parámetros hasta valores similares a los obtenidos en las aortas de control ( $P < 0.05$ ).

### **CONCLUSIONES:**

En el AAA existe una reducción de mitocondrias funcionantes con respecto a la aorta sana, siendo menor a mayor diámetro aneurismático. Además, en el AAA la fisión se encuentra aumentada y la mitofagia disminuida con acúmulo de mitocondrias disfuncionantes con respecto a la aorta no aneurismática. El uso de rivaroxabán consiguió revertir *in vitro* estas funciones mitocondriales hasta niveles similares a los de las aortas sanas.

Estos resultados sugieren la importancia de la homeostasis y funcionalidad mitocondrial en la patogenia del AAA. En nuestro conocimiento, no se había descrito previamente en la literatura el papel de la mitofagia en el AAA. Además, muestran por primera vez el posible papel del FXa endógeno en la expresión de proteínas asociadas con la homeostasis y la funcionalidad mitocondrial en el AAA, siendo el rivaroxabán una posible opción terapéutica en el AAA. Se precisan de estudios clínicos prospectivos para confirmar estos hallazgos.

## **2. RESUMEN EN INGLÉS (*SUMMARY*).**

### **Effect in mitochondrial homeostasis and functionality in abdominal aortic aneurysms and its modification through Factor Xa inhibition by Rivaroxaban.**

#### **INTRODUCTION:**

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a the fifteenth most common cause of death in western countries. However, no effective pharmacological treatment is currently available to prevent AAA development or progression.

A deep understanding of the pathogenesis of the disease is needed in order to develop new therapeutic targets. This pathogenesis of the AAA involves proteolytic degradation of extracellular matrix, vascular smooth muscle cells apoptosis, infiltration of chronic inflammatory cells and oxidative stress. Nevertheless, the specific cellular and molecular mechanisms involved in the formation, progression, and rupture of AAA are not fully understood yet.

Mitochondria have a critical role in cellular energy metabolism and they are an important source of oxidative stress. Mitochondrial function has recently been associated to cardiovascular disease, including AAA, in different studies.

Factor Xa (FXa) has pro-inflammatory and proteolytic effects on the vascular wall which are independent from prothrombin activation. Moreover, FXa can modify the expression of proteins involved in oxidative stress and energy metabolism. This activity could be mediated, at least partially, by mitochondrial dysfunction.

The presence of intraluminal thrombus (ILT) has been associated with aneurysmal growth and rupture. Increased levels of FXa have been observed in ILT, due to platelet activation and coagulation / fibrinolysis. This implies a chronic exposure of the vascular wall to this factor. Recent studies have shown the potential role of FXa in the development and progression of AAA. A reduction of inflammation, oxidative stress, anaerobic metabolism and proteolysis through selective FXa inhibition by rivaroxaban has also been reported in human AAA *in vitro* studies.

**OBJETIVE:**

To assess the potential role of mitochondrial function and mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of AAA and to study if FXa inhibition by rivaroxaban can modulate mitochondrial functionality and expression of proteins associated with mitochondrial dynamic and mitophagy in human AAA.

**MATERIAL AND METHODS:**

AAA samples were obtained from patients undergoing elective open repair of AAA (n = 6). Control samples were collected from organ donors who died due to traumatic brain injury (n = 6). Samples were incubated in RPMI medium after washing them to remove blood, fat and thrombus.

Enzymatic activity of citrate synthase (biomarker of mitochondrial density) and cytochrome C oxidase (biomarker of mitochondrial respiratory chain functionality) was determined using colorimetric kits based on its function. Expression of the Drp1 protein

(biomarker of mitochondrial fission) were assessed by Western Blot analysis. Expression of parkin and PINK1-parkin interaction in the mitochondria (biomarkers of mitophagy) were analyzed by dot-blot. FXa effect was analyzed through *in vitro* incubation of AAA samples in presence of 50 nmol / L of rivaroxaban.

## RESULTS:

The enzymatic activity of citrate synthase and cytochrome C oxidase were significantly reduced in the AAA sites in comparison to healthy aorta (citrate synthase activity in mU/min/mg protein: control:  $3.51 \pm 0.22$  vs. AAA:  $0.37 \pm 0.15$ ;  $P < 0.01$ ; cytochrome C oxidase activity in mOD/min/mg protein: control:  $8.05 \pm 1.57$  vs. AAA:  $3.29 \pm 1.05$ ;  $P < 0.05$ ). A negative correlation was observed between aortic diameter and citrate synthase activity (Rho coefficient: 0.9;  $P < 0.001$ ).

Mitochondrial expression of the Drp1 protein was higher in AAA sites ( $1126 \pm 174$  UA) than in the control samples ( $663 \pm 85$  UA;  $P < 0.05$ ).

Mitochondrial parkin expression, and mitochondrial PINK1-Parkin interaction were significantly reduced in the AAA sites (parkin:  $355.625 \pm 74.96$  UA; PINK1-parkin interaction:  $974 \pm 92.16$  UA;  $P < 0.05$ ), with respect to control aortas (parkin:  $805.833 \pm 115.32$  UA; PINK1-parkin interaction:  $2082.2 \pm 387.13$  UA;  $P < 0.05$ ).

Rivaroxaban incubation of AAA samples modified significantly all these parameters to levels similar to those of the healthy aorta controls.

**CONCLUSIONS:**

In the AAA there is a reduction of mitochondrial function with respect to the healthy aorta controls, greater to bigger aneurysm diameter. Furthermore, fission is increased and mitophagy decreased with accumulation of dysfunctional mitochondria in AAA compared with healthy aorta controls. The use of rivaroxaban was able to reverse these mitochondrial functions in vitro to levels similar to those of healthy aorta controls.

These results support the recent evidence of the importance of mitochondrial homeostasis and functionality in the pathogenesis of AAA. To our knowledge, the role of mitophagy in AAA had not been previously described. Furthermore, it shows for the first time the possible role of endogenous FXa on the mitochondria in the human AAA site. Rivaroxaban improved mitochondrial function, mitochondrial dynamics and mitophagy in AAA, being a possible therapeutic option in AAA. Prospective clinical studies are needed to confirm these findings.

# IV

---

*“La gota horada la roca, no por su fuerza,  
sino por su constancia”*

*Publio Ovidio*

# INTRODUCCIÓN



## IV. INTRODUCCIÓN.

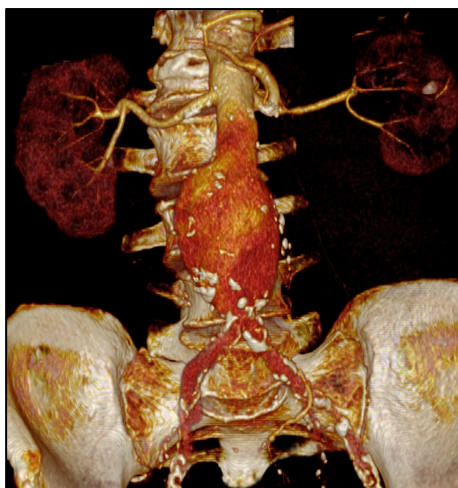
### 1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.

#### 1.1. Definición y clasificación.

El término aneurisma deriva de la palabra griega ανευρυσμα (aneurusma) que significa ensanchamiento y se refiere a una dilatación permanente e irreversible de un vaso sanguíneo (Figura 1) (1). No existe claro consenso sobre la definición de aneurisma de aorta abdominal (AAA). En 1991, la Sociedad de Cirugía Vascular y la Sociedad Internacional de Cirugía Cardiovascular (SVS / ISCVS) (1) propusieron el criterio de dilatación que supere 1.5 veces el diámetro esperado como normal. No obstante, este diámetro normal es variable en función de la edad, el sexo y el peso corporal (2). Por ese motivo, la definición más adoptada en la práctica clínica es la aportada por McGregor et al. (3) que se refiere a un AAA cuando existe una dilatación del diámetro aórtico de al menos 30 mm, lo que supone un incremento mayor de dos desviaciones estándar sobre el diámetro medio considerado como normal (4). La debilidad parietal de los aneurismas afecta a las tres capas de la pared vascular, lo que los diferencia de los pseudoaneurismas (Figura 2).

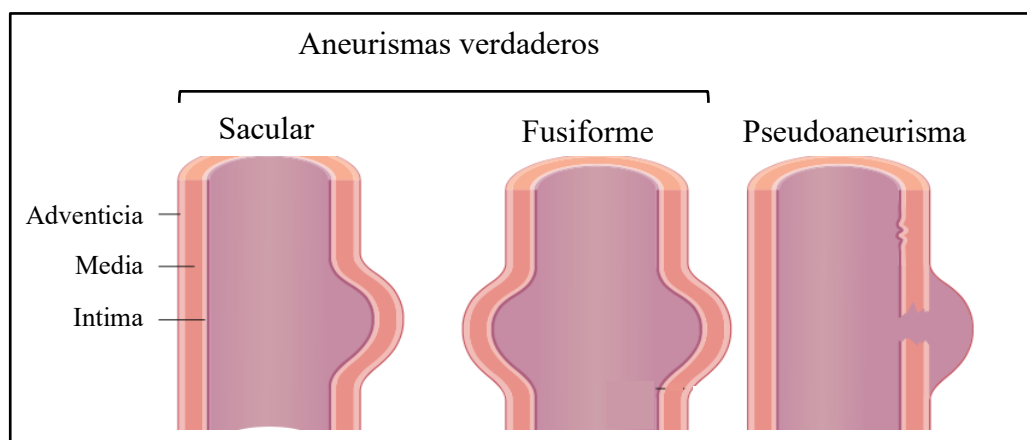
**Figura 1. Reconstrucción tridimensional de un aneurisma de aorta abdominal.**

*Fuente: producción propia. Reconstrucción realizada de angioTC con programa OsiriX®.*



Una de las clasificaciones más empleada es la propuesta por la SVS / ISCVS (1) que organiza los aneurismas en función de su etiología en congénitos, mecánicos, traumáticos, inflamatorios, infecciosos, anastomóticos y, el más frecuente, el degenerativo, antiguamente denominado aterosclerótico. Según su localización, la clasificación depende de la relación con las arterias renales existiendo aneurismas suprarrenales, pararrenales, yuxtarenales e infrarrenales. En función de su forma, como saculares o fusiformes, dependiendo de si la dilatación engloba parte o toda la circunferencia aórtica respectivamente (Figura 2). En la presente tesis doctoral se valorarán AAA infrarrenales fusiformes de etiología degenerativa, que son con mucho los más frecuentes.

**Figura 2. Clasificación de los aneurismas:** aneurismas verdaderos, cuya dilatación afecta a las tres capas de la pared aórtica y pseudoaneurismas. Dentro de los aneurismas verdaderos encontramos los saculares y fusiformes. Se observan las 3 capas que conforman la pared aórtica: íntima, media y adventicia. *Fuente: adaptado de Sakalihan N, et al. Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers. 2018 Oct 18;4(1):34.*



## 1.2. Prevalencia.

Los estudios de necropsias arrojaron los primeros datos de prevalencia del AAA, con un 4.7% en varones y un 1.2% en mujeres con edades comprendidas entre 65 y 74 años en Suecia (2). Actualmente, los estudios de cribado aportan la mejor estimación, no obstante, las cifras dependerán del sexo, la edad, el área geográfica y la definición de AAA adoptada (5).

Según el meta-análisis realizado en 2013 por Li X et al. (5) la prevalencia en la población general se estima en un 4.8% siendo mayor en varones (6%) que en mujeres (1.6%). En Europa, la prevalencia ha disminuido considerablemente en las últimas décadas, sobre todo en varones, situándose en torno al 2.3 - 2.5%, asociado presumiblemente al menor consumo de tabaco (5-7).

### **1.3. Factores de riesgo.**

El tabaquismo es el factor ambiental de riesgo más importante para el desarrollo y progresión de un AAA, estimándose que el 90% de pacientes con AAA han sido fumadores en algún momento de su vida. El riesgo es dosis dependiente, aumentando con los años de consumo y el número de paquetes, existiendo una odds ratio (OR) entre 2.6 y 12.1 en función de los paquetes / año (8,9).

La historia familiar aumenta considerablemente el riesgo (OR: 3.80); tanto es así que se estima que los pacientes con un familiar de primer grado afectado tienen un riesgo de entre un 15 y un 20% de desarrollar un AAA, frente al 1 - 3% del resto (10-14). Otros factores relacionados con los AAA son: la edad, con una OR de hasta 28.4 en pacientes entre 80 y 84 años; el sexo masculino (OR: 5.7); la presencia de aterosclerosis en otro territorio (OR: 1.18 - 1.72); la hipertensión arterial (HTA) (OR: 1.25); la hipercolesterolemia (OR: 1.34) y el sobrepeso (OR: 1.20) (9,15).

De forma llamativa, los pacientes diabéticos poseen menor riesgo de desarrollar un AAA (OR: 0.75). También parece disminuir levemente el riesgo la realización de ejercicio físico y la ingesta de frutas, verduras y nueces (OR: 0.86 - 0.91) (16-18).

#### 1.4. Historia natural.

La evolución natural del AAA es el crecimiento subclínico del mismo hasta su potencial rotura. La tasa de crecimiento es variable, entre 1 y 6 mm al año, sin diferencias entre géneros. El crecimiento es lento en los AAA de pequeño tamaño, disparándose la tasa de expansión exponencialmente con el aumento del diámetro aórtico (Tabla 1). Este hecho justifica que se deba llevar a cabo un seguimiento más estrecho en los AAA de mayor tamaño. Este crecimiento también puede verse influenciado por el tabaquismo, que aumenta la tasa de crecimiento en torno a un 16%. Se ha observado que, paradójicamente, los pacientes diabéticos presentan una tasa de crecimiento más lenta (hasta un 25% menor), lo que podría estar en relación con la toma de metformina o con la resistencia que pudiera producir la glicación a la proteólisis (19–21).

**Tabla 1. Tasas estimadas de crecimiento y rotura del aneurisma de aorta abdominal (AAA) en varones y mujeres con aneurismas de pequeño tamaño.** Fuente: recuperado de Lahoz C, et al. SEA-SEACV 2015: Guía para el diagnóstico y tratamiento del aneurisma de aorta abdominal. 2016;28(Supl 1):1-49.

		Diámetro del AAA (mm)				
		30	35	40	45	50
Hombres	Tasa de crecimiento (mm/año)	1,28	1,86	2,44	3,02	3,61
	Tº rango quirúrgico (años)	7,4	5	3,2	1,8	0,7
	Tº riesgo rotura de 1% (años)	8,5	5,5	3,5	2,2	1,4
Mujeres	Tasa de crecimiento (mm/año)	1,46	1,98	2,51	3,06	3,62
	Tº rango quirúrgico (años)	6,9	4,8	3,1	1,8	0,7
	Tº riesgo rotura de 1% (años)	3,5	2,1	1,4	0,9	0,7

A pesar de los programas de cribado y de las mejoras en el tratamiento, la rotura de un AAA continua asociando una muy alta mortalidad que se sitúa entre el 65 y 85% (22). El riesgo de rotura aumenta de forma exponencial con el diámetro, así en el ADAM trial el riesgo de rotura se estimó en un 9% anual para diámetros entre 55 y 59 mm, del 10% entre 60 y 69 mm y del 33% para los AAA a partir de 70 mm (23). Sin embargo, análisis más recientes

indican que el riesgo de rotura anual es menor actualmente, estimándose en un 5.3% para diámetros entre 55 y 70 mm y en un 6.3% en pacientes con AAA > 70 mm, posiblemente debido a la disminución de pacientes fumadores con AAA (9).

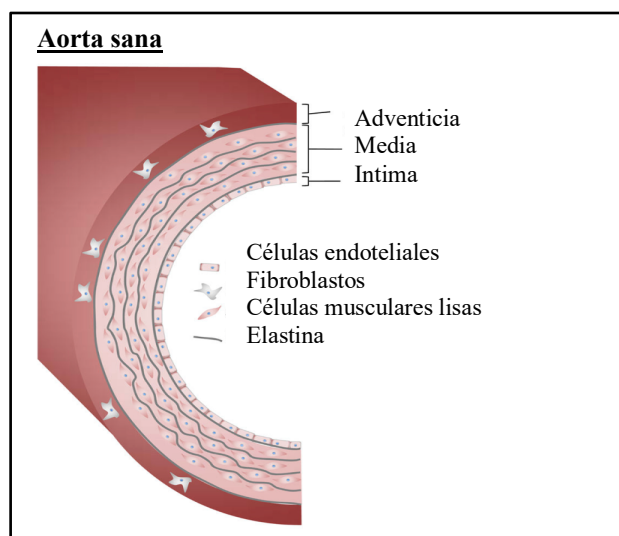
No obstante, aunque el diámetro máximo es un factor de riesgo de crecimiento y rotura y es un parámetro bien establecido para la toma de decisiones, se consigue una mejor predicción basada en los factores biomecánicos. El estrés en la pared aórtica; la resistencia de la misma, en la cual influyen la edad, el diámetro y la presencia de trombo intraluminal (TIL); y el índice entre ambos parecen ser mejores predictores de rotura que el diámetro máximo (24–27). Asimismo, se estudia la utilidad de la tomografía computarizada por emisión de positrones (PET-TC) (28), del volumen de TIL por tomografía computarizada con contraste (angioTC) (29) y de los modelos hemodinámicos como predictores de crecimiento y rotura (30). Otros factores de riesgo asociados a la rotura son: el sexo femenino, el tabaquismo activo, la HTA y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (31–35). Se sugiere que el uso de fluoroquinolonas puede aumentar el riesgo de rotura del AAA, al actuar sobre el colágeno de la pared aórtica (36). El papel del TIL se estudiará en mayor detalle dentro del apartado de patogenia.

## **1.5. Anatomía patológica de la aorta sana y aneurismática.**

### **1.5.1. Aorta sana.**

La aorta sana posee tres capas, desde el interior de la luz del vaso encontramos: la capa íntima, la media y la adventicia (Figura 3).

**Figura 3. Esquema representativo de la estructura aórtica normal:** destaca la barrera intacta de células endoteliales en la capa íntima, así como la perfecta estructuración de matriz extracelular (representada por la elastina) y células musculares lisas en lamelas. *Fuente: Adaptado de Dale MA, et al. Inflammatory Cell Phenotypes in abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol.2015;35(8):1746-175*



La capa íntima está compuesta por el endotelio, en contacto con la luz del vaso, la lámina basal y la lámina elástica interna, en contacto con la capa media. El endotelio está formado por una capa de células endoteliales planas, con un glucocálix en contacto con el flujo sanguíneo. Se encuentran unidas entre ellas con zonas de unión firme (uniones herméticas), que proporcionan una barrera física, y zonas de uniones adherentes, que permiten el transporte de oxígeno, iones, nutrientes y otros factores reguladores que permiten la comunicación intercelular (37). Además, gracias al glucocálix y a la formación de prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y ADPasa, ejercen una función antitrombótica impidiendo la agregación plaquetaria. De este modo, ejercen una acción reguladora sobre la permeabilidad, la proliferación celular, la hemostasia y el tono vasomotor (38). La lámina basal tiene la función de dar soporte al endotelio. Consiste en una matriz extracelular (MEC) formada por células musculares lisas (CML) y tejido conectivo rico en colágeno IV (formado por las células endoteliales) además de glicoproteínas, moléculas de adhesión y proteoglicanos. Cumplen además una función importante en la permeabilidad vascular y en la regeneración de las

células endoteliales. Por último, la lámina elástica interna está formada principalmente por elastina. Presenta fenestraciones para permitir la difusión de oxígeno, iones y nutrientes a las capas más internas de la pared del vaso pero ejerciendo una función barrera ante las macromoléculas (37).

La capa media contiene CML en mayor cuantía, así como MEC que incluye fibras perfectamente ordenadas de elastina y colágeno (tipo I y III), fibronectina, fibrilina, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Se organiza en unidades funcionales, denominadas lamelas, cuya composición y distribución es crítica para la distensibilidad y resistencia de la pared vascular; en concreto la elastina da resistencia frente a la dilatación y el colágeno frente a la rotura (39). Las CML poseen un importante papel en la fisiología de la pared aórtica siendo responsables de la síntesis de los elementos de la MEC y del remodelado del vaso en respuesta al estrés (40). Por último, encontramos la lámina elástica externa que separa la capa media de la adventicia.

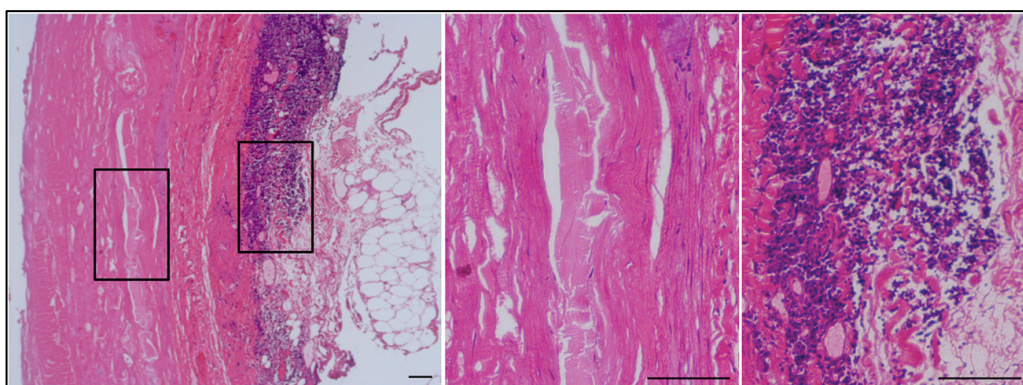
Finalmente, se encuentra la adventicia con fibroblastos, fibras de colágeno intersticial, fibras nerviosas, que regulan la función vasomotora de las CML (vasodilatación mediante receptores  $\beta$ -adrenérgicos y vasoconstricción por los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos), y pequeños vasos sanguíneos, conocidos como vasa-vasorum, que se encargan de nutrir la región más externa de la pared del vaso.

### 1.5.2. Aorta aneurismática.

Cuando ocurre la degeneración aneurismática del vaso, existen cambios histológicos en todas las capas promovidos, como se expondrá más adelante, por una excesiva proteólisis, un

elevado estrés oxidativo, un aumento de la apoptosis de las CML y una importante reacción inflamatoria crónica transmural, de predominio en la adventicia. En las figuras 4 y 5 se muestran respectivamente una fotografía y un esquema de la estructura de la aorta aneurismática.

**Figura 4. Anatomía patológica del aneurisma de aorta abdominal (AAA):** Tinción con hematoxilina-eosina de un corte transversal de un AAA. Las áreas recuadradas se muestran a la derecha a mayor aumento. El panel central muestra la ausencia de células musculares lisas en la capa media. A la derecha se observa la adventicia con un importante infiltrado inflamatorio. Barras: 150  $\mu$ m. Fuente: Adaptado de Torres-Fonseca M, et al. *Pathophysiology of abdominal aortic aneurysm: biomarkers and novel therapeutic targets. Clin Investig Arterioscler.* 2019 Jul-Aug;31(4):166-177.



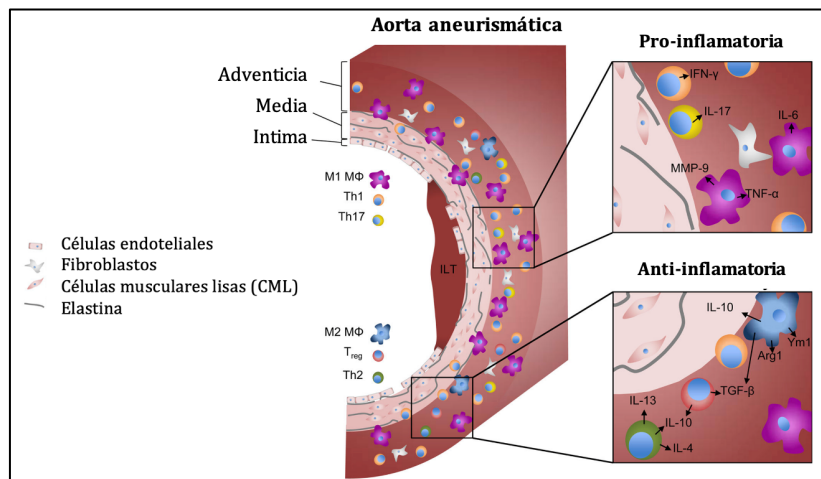
Las células endoteliales, por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS: *reactive oxygen species*), pueden contribuir a la desestructuración y disfunción endotelial con pérdida de sus propiedades antitrombóticas, lo que favorece la aparición de TIL que engloba eritrocitos y hemoglobina. La hemoglobina va a promover la activación plaquetaria, la activación de la coagulación y de la fibrinólisis, y con ello la formación de plasmina que es una de las moléculas capaces de activar las metaloproteasas (MMP). Asimismo, esta activación plaquetaria perdura la inflamación de la pared del vaso. Por otro lado, la presencia de TIL impide la difusión de oxígeno, generando un estado de hipoxia relativa (41,42).

En la capa media, esencial en la distensibilidad y resistencia de la pared y, por tanto,

fundamental en la historia natural del AAA, la inflamación provoca un aumento de la actividad proteolítica y un índice apoptótico elevado de las CML. Estas células se encargan en condiciones normales de la producción de la MEC, pero debido a su disminución en número, no pueden llevar a cabo el remodelado. Además, se suma que las existentes se encuentran alteradas, con mayor generación de MMP. Ello va a generar la degradación de la elastina y un aumento relativo de la carga en colágeno, favoreciendo la rigidez del vaso inicialmente y, en segundo término, por pérdida de colágeno funcional, se pone en riesgo la integridad estructural de la pared vascular (39,43).

Por su parte, la inflamación en la adventicia promueve una respuesta inmuno-inflamatoria, fibrótica y neoangiogénica. No obstante, no se ha aclarado si esta neovascularización es consecuencia de la inflamación transmural o si pudiese ser uno de los elementos etiopatogénicos iniciales que promuevan la degeneración aneurismática (43,44).

**Figura 5. Esquema representativo de la estructura aórtica en un aneurisma de aorta abdominal.** Se observa una importante inflamación de la pared, con predominio de células T pro-inflamatorias Th1 y Th17; estando en menor cuantía las de tipo T reguladoras anti-inflamatorias y las Th2. Dentro de los macrófagos, destacan los subtipos pro-inflamatorios M1 frente a los anti-inflamatorios y reparadores M2, aunque ambos están aumentados. En las fases iniciales, ocurre un engrosamiento de la pared aórtica a expensas de la adventicia, pero se acaba produciendo la fragmentación de elastina y la apoptosis de las células musculares lisas, lo que finalmente produce el característico adelgazamiento de la capa media. Asimismo, se observa una pérdida células endoteliales que son sustituidas por trombo intraluminal (ILT). Fuente: Adaptado de Dale MA, et al. *Inflammatory Cell Phenotypes in abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(8):1746-1755.



## **1.6. Diagnóstico.**

### 1.6.1. Presentación clínica.

La mayoría de los AAA son asintomáticos y se descubren como hallazgo incidental en una prueba de imagen realizada por otra patología o dentro de programas de cribado. En raras ocasiones pueden existir síntomas inespecíficos de dolor abdominal vago o dolor lumbar crónico como consecuencia de la compresión de estructuras vecinas. Excepcionalmente, pueden diagnosticarse por presentarse una complicación, como la embolización distal o la trombosis. En la exploración física, puede palparse una masa pulsátil abdominal, no obstante, su sensibilidad es moderada, dependiendo principalmente del perímetro abdominal del paciente, del tamaño del aneurisma y de la habilidad del explorador (45,46).

Los AAA rotos (AAAR) suelen tener una clínica más florida con un inicio brusco de dolor abdominal o lumbar, distensión abdominal y/o shock hemorrágico. Más raramente, pueden manifestarse como una fístula aorto-entérica o arterio-venosa cuando la rotura se produce a otro órgano, como el duodeno, o la vena cava inferior respectivamente (47).

### 1.6.2. Diagnóstico por imagen.

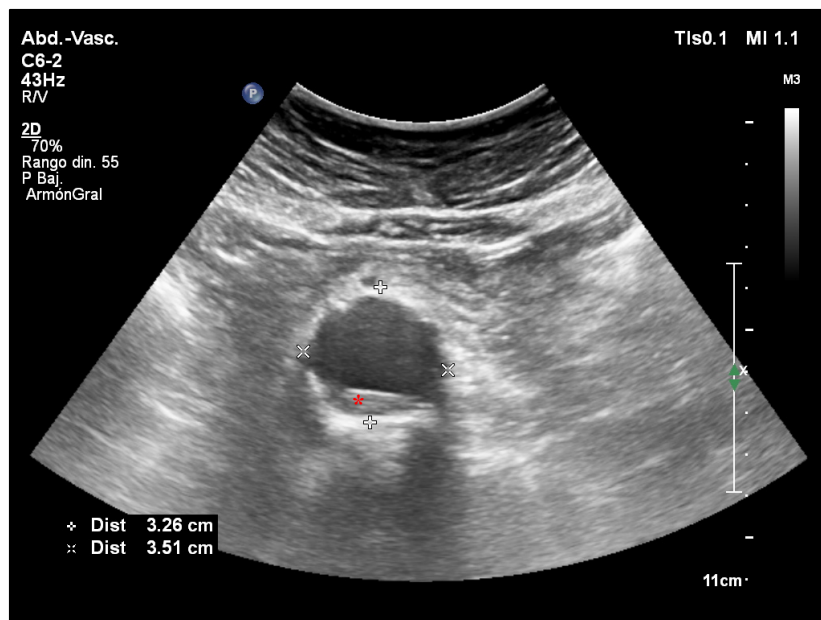
El diagnóstico de certeza se establece con una prueba de imagen que ponga en evidencia la presencia de dicha dilatación.

#### 1.6.2.1. Ecografía abdominal.

En pacientes asintomáticos, la ecografía abdominal detecta la presencia de un AAA con una sensibilidad y especificidad cercana al 100% (Figura 6) (48). Es la prueba de elección para el cribado y el seguimiento del AAA de pequeño tamaño por ser precisa, reproducible,

barata e inocua (48,49). No obstante, presenta una serie de limitaciones: 1) existe una importante variabilidad intra e inter-observador, sobre todo si no se presta especial atención a los estándares de medición (50); 2) en un 1- 2% de pacientes no es posible valorar la aorta abdominal por obesidad, presencia de gases o superposición de asas (51) y 3) no permite planificar el tratamiento endovascular del AAA.

**Figura 6. Imagen ecográfica abdominal en modo B de un aneurisma de aorta abdominal de pequeño tamaño.** Se aprecia la presencia de trombo intraluminal posterior (\*). Fuente: producción propia. Tomada en consulta de Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos.

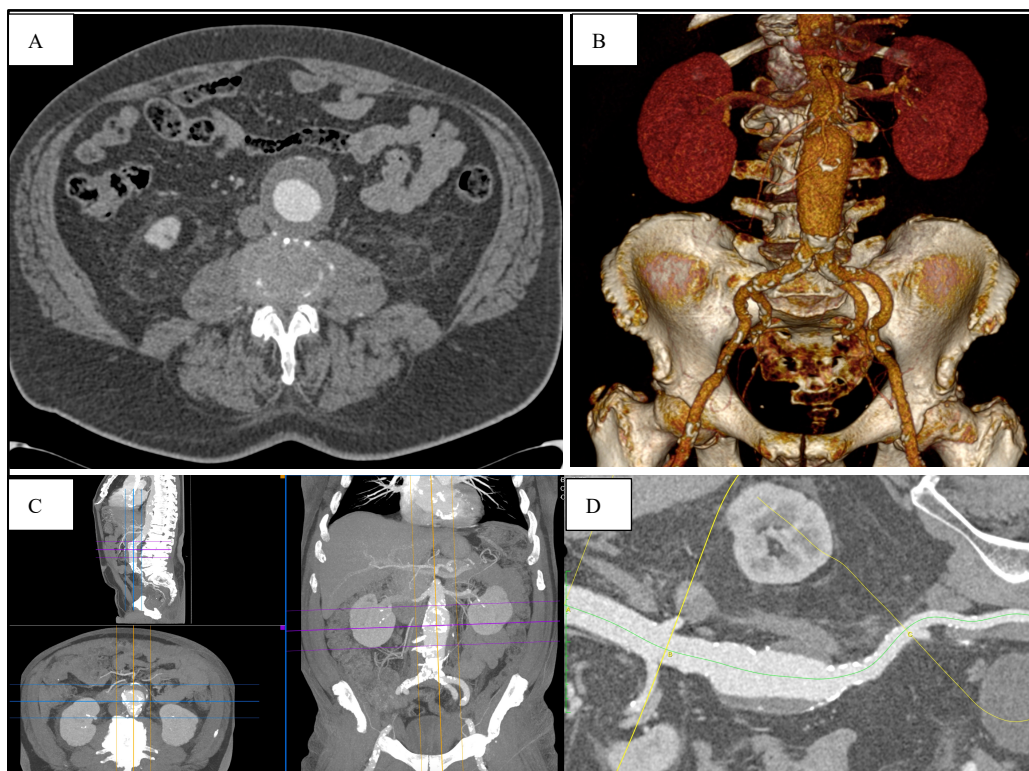


#### 1.6.2.2. Tomografía computarizada con contraste (angioTC).

Actualmente es considerada por las guías clínicas la prueba *gold standard* para el diagnóstico del AAA (4,9,47). Tiene una sensibilidad cercana al 100%, siendo más exacto y reproducible que la ecografía en la medición de diámetros (52,53). Con mayor frecuencia, el angioTC aporta diámetros mayores comparados con la ecografía y se ha observado que hasta el 70% de AAA de entre 50 y 55 mm por ecografía tenían mediciones por encima de 55 mm en el angioTC (50). El angioTC, aporta además información anatómica de toda la longitud

aórtica, de las arterias renales, del sector iliaco y de las estructuras circundantes. Ello resulta muy útil para la planificación terapéutica, tanto endovascular como de cirugía abierta, sobre todo con el procesado de las imágenes en estaciones de trabajo que permitan su reconstrucción en 3 planos (Figura 7). Su principal inconveniente es la radiación ionizante y la necesidad de contrastes yodados nefrotóxicos.

**Figura 7. Imagen de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) por angioTC.** A. Corte axial de AAA en el que se observa un trombo intraluminal circunferencial. B. Reconstrucción tridimensional. C. Imagen multiplanar en máxima intensidad de proyección. D. Reconstrucción por centro de flujo. *Fuente: A. angioTC recuperado de base de datos de Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos. B, C y D. Producción propia tras procesado de imágenes en la estación de trabajo OsiriX®.*



Actualmente, el angioTC con software especializado en la reconstrucción tridimensional es considerada también la prueba de imagen de elección para la toma de decisiones, la planificación quirúrgica y el seguimiento postoperatorio del AAA. Asimismo, es de elección para el diagnóstico y manejo del AAAR (Figura 8) (4,9,47).

**Figura 8. Corte axial de un aneurisma de aorta abdominal roto por angioTC.** Fuente: recuperado de base de datos de Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos.



#### 1.6.2.3. Resonancia magnética nuclear.

La resonancia magnética nuclear (RMN) no requiere el uso de contrastes yodados ni expone al paciente a radiación ionizante, permitiendo además la obtención de imágenes dinámicas con la utilización de gadolinio (Figura 9). No obstante, su menor disponibilidad, sus limitaciones en pacientes con claustrofobia o implantes metálicos y la escasez de estudios que lo comparen con el *gold standard*, el angioTC, hace que su utilización actual sea limitada (54).

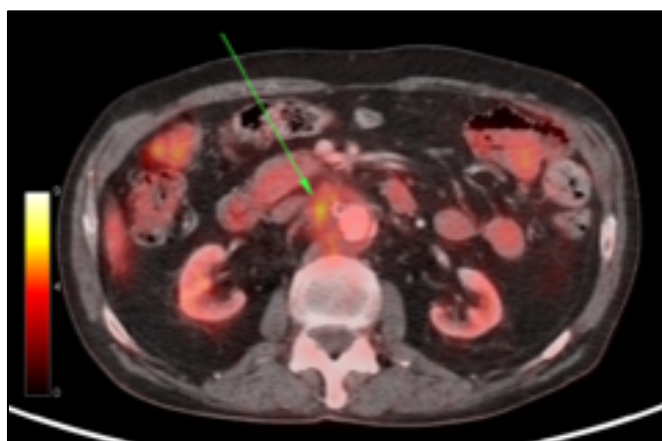
**Figura 9. Imagen de un aneurisma de aorta abdominal e iliacas comunes por angio-RMN (corte coronal).** Fuente: tomado de Moñux Ducajú G. *Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.*



#### 1.6.2.4. Tomografía computarizada por emisión de positrones (PET-TC).

El PET-TC con fluoro-desoxiglucosa (Figura 10) localiza y cuantifica la actividad metabólica de las células, considerándose actualmente una prueba de imagen complementaria en el diagnóstico y seguimiento de los AAA inflamatorios, infecciosos y en las infecciones de injertos o endoprótesis post-tratamiento. Se encuentra en estudio su utilidad para identificar aquellos AAA inestables, con mayor riesgo de progresión y rotura.

**Figura 10. Imagen de un aneurisma de aorta abdominal por PET-TC (corte axial).** La flecha marca la región aneurismática con mayor captación de contraste. *Fuente: recuperado de base de datos de Servicio de Cirugía Vascul ar del Hospital Clínico San Carlos.*



#### 1.6.3. Marcadores bioquímicos.

Se ha observado una asociación entre la existencia de un AAA y los valores plasmáticos elevados del complejo trombina – antitrombina III, fibrinógeno y dímero D. Estos marcadores reflejan los ciclos de formación de coágulo y fibrinolisis que se producen de manera casi constante en el TIL del AAA (55,56). En el caso del dímero D, se ha objetivado un aumento de sus cifras en relación con el diámetro aneurismático y una disminución tras el tratamiento del AAA (55,57). También se han visto elevados otros biomarcadores no hemostáticos en los pacientes con AAA como la interleucina (IL) 6, la MMP-9, la elastasa

neutrofílica, la proteína C reactiva y marcadores cardíacos como la troponina T y la porción N terminal del péptido natriurético cerebral (58,59).

Actualmente, ningún biomarcador o combinación de ellos se considera lo suficientemente sensible ni específico para tener validez clínica en el diagnóstico o pronóstico del AAA (4,9,60).

### **1.7. Cribado.**

La evolución silente del AAA hasta su rotura, la alta tasa de mortalidad en estos casos, la existencia de una técnica diagnóstica no invasiva, con alta sensibilidad y especificidad, como es la ecografía abdominal, y los buenos resultados de su tratamiento electivo, convierten al AAA en una patología atractiva para el cribado.

La revisión sistemática de Cosford PA et al. (61) mostró que la realización de programas de *screening* entre los 65 y 79 años reducía la mortalidad relacionada con el aneurisma en varones (OR: 0.6 IC 95% 0.47 – 0.78), siendo la costo-efectividad aceptable en este subgrupo. Además, en varios de los estudios randomizados incluidos (62,63) también se observó una disminución de la mortalidad por todas las causas en varones, lo que fue confirmado posteriormente por un reciente estudio sueco (64). En base a estas evidencias, la última guía europea recomienda el cribado en todo varón mayor de 65 años. No obstante, en las mujeres no existe suficiente evidencia para recomendar el cribado masivo.

En caso de historia familiar de primer grado con AAA, debido a que la rotura puede ocurrir a menor edad y con menores diámetros, el cribado se debe realizar en hombres y

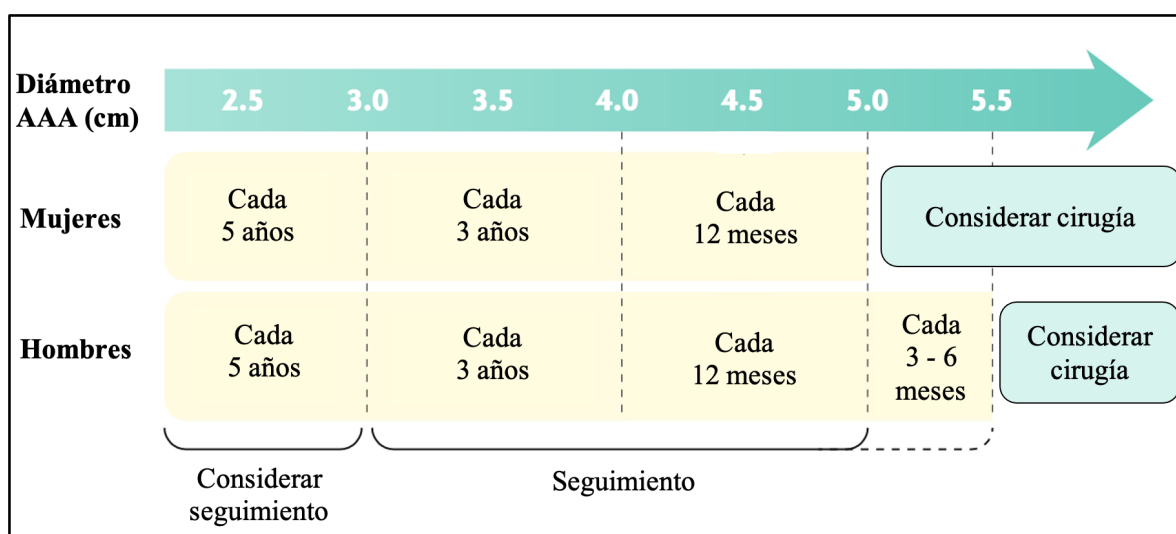
mujeres a partir de los 50 años y cada 10 años. Por último, dada la alta asociación entre AAA y aneurismas periféricos (poplíteo, iliaco, femoral), se debe hacer cribado de AAA en estos pacientes cada 5 - 10 años (47).

### 1.8. Seguimiento del AAA de pequeño tamaño.

#### 1.8.1. Intervalos de seguimiento.

Se consideran aneurismas de pequeño tamaño aquellos que aún no se encuentran en rango de ser intervenidos quirúrgicamente. La prueba de imagen de elección es la ecografía abdominal y los intervalos de revisión van a variar en función del diámetro máximo del AAA (32,65). Entre los 30 y 39 mm cada 3 años, entre 40 y 49 mm anuales y a partir de 50 mm el seguimiento debe realizarse cada 3 - 6 meses (9,47). La figura 11 muestra de forma esquemática estos datos.

**Figura 11. Protocolo de seguimiento en pacientes con aneurisma de aorta abdominal (AAA) fusiformes asintomáticos.** En casos de rápido crecimiento (> 10 mm / año) o de historia familiar de AAA roto se debe considerar cirugía electiva con menor diámetro. Entre los 25 y 29 mm de diámetro aórtico (ectasia aórtica) se debe considerar el seguimiento, sobre todo en pacientes jóvenes. *Fuente: Adaptado de Sakalihan N, et al. Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers. 2018 Oct 18;4(1):34.*



### 1.8.2. Tratamiento médico para reducir el crecimiento del AAA.

Hasta la fecha, no se ha demostrado que ningún fármaco tenga la suficiente efectividad para disminuir la tasa de crecimiento o el riesgo de rotura de los AAA incluyendo las estatinas, los inhibidores del sistema renina angiotensina, los betabloqueantes, la doxiciclina, el pemirolast (fármaco estabilizador de mastocitos), la metformina y el ticagrelol. Pese a los resultados alentadores de algunos de ellos en estudios animales, ninguno ha demostrado su efectividad en la progresión del AAA humano (66–71). Asimismo, el ejercicio físico tampoco ha demostrado su eficacia (18). La única medida que ha demostrado frenar el riesgo de crecimiento, en aproximadamente un 20%, y el riesgo de rotura, es el abandono del hábito tabáquico, por lo que se debe ofrecer ayuda al paciente con este objetivo (19,20,65). Pese a que ningún antihipertensivo ha demostrado reducir la tasa de crecimiento del AAA, un metaanálisis sugiere una pequeña reducción en la tasa de rotura y en la necesidad de reparación en pacientes bajo tratamiento antihipertensivo para el control de su HTA (71).

### 1.8.3. Tratamiento médico para reducir el riesgo cardiovascular.

Los pacientes portadores de AAA asocian una mortalidad de causa cardiovascular del 3% anual, por lo que es imperativo un control estricto de los factores de riesgo cardiovascular. Un estudio de Reino Unido que incluyó 12485 pacientes mostró una mejoría en la supervivencia a 5 años en los pacientes bajo tratamiento con estatinas (68% vs 42%), antiagregantes (64% vs 40%) y antihipertensivos (62% vs 39%) (72). De esta forma, se debe considerar el tratamiento de la HTA y el uso de estatinas y antiagregantes en todos los pacientes con AAA (47).

## **1.9. Tratamiento.**

### 1.9.1. La decisión de tratar quirúrgicamente.

Como se ha presentado anteriormente, no existe en la actualidad ninguna alternativa farmacológica para el tratamiento de los AAA, siendo la cirugía la única opción terapéutica. Las indicaciones de tratamiento quirúrgico van encaminadas a la prevención de su eventual rotura y dependerán del riesgo estimado de rotura, del riesgo quirúrgico del paciente y de su esperanza de vida.

Son cuatros los estudios randomizados que han estudiado el tratamiento precoz de los AAA fusiformes de entre 40 y 55 mm de diámetro máximo, tanto con cirugía abierta (UKSAT y ADAM) como con técnicas endovasculares (CAESAR y PIVOTAL). Los datos obtenidos se resumen en la revisión de la Cochrane concluyendo que en varones con AAA menores de 55 mm, es seguro y costo - efectivo el manejo conservador (73). De esta forma, existe consenso entre la guía Americana y Europea en que en varones sanos el tratamiento quirúrgico electivo debe plantearse en aquellos AAA con un diámetro  $\geq 55$  mm (9,47). En mujeres el riesgo de rotura es mayor, existiendo un riesgo similar con diámetros de 45 mm en mujeres que de 55 mm en hombres (20,32,34). No obstante, en ellas la mortalidad peri-operatoria es mayor que en hombres, tanto en tratamiento endovascular (EVAR del inglés: *Endovascular Aneurysm Repair*) (2.3% vs 1.4% respectivamente, OR 1.67, IC 95% 1.38 – 2.04), como en cirugía abierta (CA) (5.4% y 2.8% respectivamente, OR 1.76, IC 95% 1.35 – 2.0) (74). Teniendo todo ello en cuenta, y a pesar de carecer de buena evidencia, en mujeres se recomienda la intervención con diámetros de AAA cercanos a 50 mm, siempre que el riesgo quirúrgico sea aceptable (Figura 11). En pacientes de edad avanzada o importante comorbilidad, el manejo debe individualizarse. Se ha planteado, aunque con escasa evidencia, el tratamiento precoz de

AAA con un rápido crecimiento aórtico ( $\geq 10$  mm / año), siempre previa comprobación de mediciones (9,47).

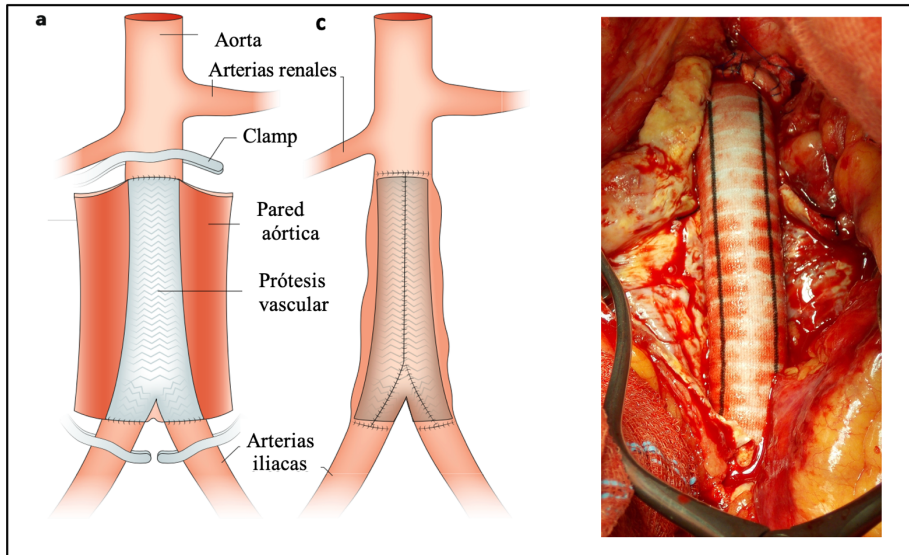
Los AAAR suponen una emergencia quirúrgica, independientemente de su diámetro. El tiempo hasta la intervención influye directamente en la morbimortalidad (75,76) por lo que se recomienda que sea menor a 90 minutos desde la llegada del paciente al hospital (9). Existe mayor controversia en los AAA sintomáticos no rotos ya que pese a su mayor riesgo de rotura, el manejo urgente aumenta las complicaciones peri-operatorias, por lo que puede ser apropiado retrasar el tratamiento unas horas para optimizar la situación del paciente o para asegurar una cirugía con características electivas en cuanto a equipo habitual y a disponibilidad de dispositivos (77,78). Durante el tiempo de demora se debe mantener una monitorización estrecha del paciente hasta su intervención (9,47).

#### 1.9.2. Elección del tipo de tratamiento quirúrgico.

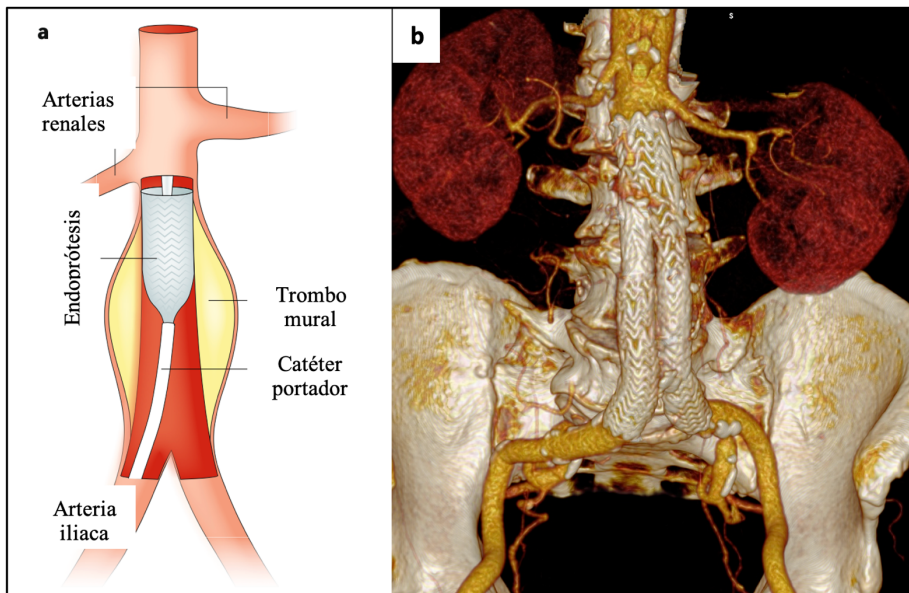
La reparación del AAA puede realizarse mediante CA o EVAR. La CA consistiría en el clampaje aórtico y la resección del aneurisma con interposición de una prótesis anastomosada proximalmente cerca de las arterias renales y distalmente en aorta distal, iliacas o femorales, según la anatomía del paciente (Figura 12).

En el caso del EVAR, se implanta habitualmente por vía femoral una endoprótesis con anclaje proximal y distal en región no dilatada para excluir el aneurisma de la circulación y conseguir la trombosis del saco aneurismático (Figura 13).

**Figura 12. Esquema de la reparación quirúrgica de un aneurisma de aorta abdominal (AAA) mediante cirugía abierta.** a) muestra el clampaje proximal durante la excisión del AAA, debe realizarse preferiblemente infrarrenal (si la anatomía del AAA lo permite) con la anastomosis yuxta-renal. Distalmente, la anastomosis varía en función de la anatomía. En este caso se muestra un bypass aorto-biiliaco con clampaje distal en iliacas primitivas. b) una vez se realiza el bypass, la prótesis se cubre con la pared aneurismática para aislarlo del intestino. c) fotografía de bypass aorto-aórtico con prótesis de Dacron, sobre las paredes del aneurisma abierto de forma longitudinal. Fuente: a y b) Adaptado de Sakalihan N, et al. *Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers. 2018 Oct 18;4(1):34.* c) Fuente recuperado de base de datos de Servicio de Cirugía Vasculardel Hospital Clínico San Carlos.



**Figura 13. Esquema de la reparación endovascular de un aneurisma de aorta abdominal (AAA).** a) muestra la liberación parcial de una endoprótesis aórtica de fijación infrarrenal. La endoprótesis excluirá el AAA mediante un sellado proximal en el cuello del AAA (región de aorta no dilatada entre las arterias renales y el inicio de la región dilatada) b) resultado final tras la exclusión del AAA mediante una endoprótesis aorto-biiliaca en una reconstrucción tridimensional del angioTC. Fuente: a) Adaptado de Sakalihan N, et al. *Abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Dis Primers. 2018 Oct 18;4(1):34.* b) Fuente producción propia, reconstrucción realizada mediante la estación de trabajo OsiriX®.



Existen múltiples estudios randomizados comparando ambas técnicas, el EVAR-1 (79), DREAM (80), OVER (81) y ACE (82). Sus datos son incluidos en un reciente meta-análisis que concluye que aunque el EVAR se asocia a una menor mortalidad precoz (en los primeros 6 meses), sobre todo a expensas de la mortalidad peri-operatoria a 30 días, este beneficio se pierde a lo largo del seguimiento, no existiendo diferencias en supervivencia a partir del año y hasta los 5 años de la intervención. El EVAR se asoció a una mayor tasa de reintervenciones, precoces y tardías, y no se observó beneficio frente a la CA en pacientes con insuficiencia renal o antecedentes coronarios (83). No obstante, estos datos deben ser interpretados con cautela ya que algunos estudios no incluyen ciertas reintervenciones tras la CA (en el estudio OVER que sí incluyó las reintervenciones del tipo obstrucción intestinal, hernias incisionales y otras complicaciones derivadas de la laparotomía se encontraron diferencias mucho menos relevantes). Además, la mayoría de los dispositivos endovasculares incluidos en los estudios EVAR, DREAM y OVER son de primera o segunda generación, con lo que la mejoría de las endoprótesis y la utilización actual de anestesia local o regional para estos procedimientos puede mejorar los resultados del EVAR en futuros estudios.

Por lo tanto, y hasta contar con mayor evidencia, la elección del tratamiento debe ser individualizada en función de si la anatomía aorto-iliaca es favorable para EVAR así como de la esperanza de vida, riesgo quirúrgico y preferencias del paciente (47).

## **2. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.**

### **2.1. Teoría aterosclerótica.**

Hasta hace 40 años, existía la creencia de que el AAA degenerativo era secundario a la aterosclerosis, de forma que la placa aterosclerótica era la responsable del crecimiento aórtico

compensatorio (84). En la actualidad, pese a la presencia casi invariable de placas de ateroma en los aneurismas, esa creencia etiológica está superada por la evidencia aportada por estudios epidemiológicos, histológicos y biológicos (85–87).

En los años 80, en el artículo publicado por Tilson et al. (86), se cuestionó por primera vez esta teoría por las diferencias poblacionales entre los pacientes con aneurismas y con enfermedad oclusiva. Aunque poseen factores de riesgo compartidos, principalmente el tabaquismo, la población con enfermedad aneurismática es una década mayor y con una mucha mayor relación hombre / mujer. A la exploración física, los pulsos femorales estaban presentes en 48 de los 50 pacientes con AAA y sólo 3 asociaban claudicación. En cuanto a la distribución, la arteria iliaca externa, resistente a la dilatación aneurismática, es una de las localizaciones preferentes de la enfermedad oclusiva. Posteriormente, se vio que la diabetes, que tiene una fuerte relación directa con la aterosclerosis, se asocia de forma inversa con la enfermedad aneurismática (88).

Otro rechazo a esta teoría se basa en el modelo experimental en ratones con deficiencia en la apolipoproteína E ( $ApoE^{-/-}$ ) estimulados con angiotensina II (87). En ello, el desarrollo de lesiones ateroscleróticas solo ocurre después del desarrollo del AAA. De esta forma, las placas ateroscleróticas encontradas en los segmentos aneurismáticos parecen ser secundarias a la dilatación del vaso por alteración del flujo laminar normal, lo que provoca la proliferación subintimal y la aparición de la placa.

Además, la histología de la aorta aneurismática y aterosclerótica difiere. En ambas existe un estado proinflamatorio de la pared, pero con diferencias reseñables. En la enfermedad

aterosclerótica la inflamación es de menor cuantía, se localiza predominantemente en la íntima, el infiltrado predominante (casi el 100%) es de linfocitos T con una relación CD4/CD8 de 4/1 y los macrófagos existentes se localizan en la propia placa. En los AAA el infiltrado es más abundante y transmural, aunque de localización preferente en la adventicia, siendo un 75 - 80% linfocitos T con una relación CD4/CD8 de 7/1 y un 20 - 25% linfocitos B, con macrófagos de localización en la capa media y adventicia. Asimismo, en la aterosclerosis existe una proliferación de CML, mientras que el AAA se caracteriza por una apoptosis de dichas células (89,90).

## **2.2. Teoría mecánica.**

Factores hemodinámicos (mecánicos) pueden contribuir al desarrollo de los AAA. Sobre la pared de la aorta normal se ejercen 2 fuerzas biomecánicas, una circunferencial o tangencial, como consecuencia de la presión arterial y sus oscilaciones durante el ciclo cardíaco, y otra paralela a la luz del vaso, denominada fuerza de cizallamiento, por el arrastre del flujo sanguíneo sobre la superficie endotelial del vaso. El término “estrés” se refiere a la cantidad de fuerza ejercida sobre la pared vascular, mientras que la “tensión” se refiere a la deformación mural inducida por ese esfuerzo.

Según la teoría mecánica, la degeneración aneurismática y su posterior rotura son secundarias al estrés que generan estas fuerzas mecánicas, principalmente a la ejercida por el flujo pulsátil que es 10.000 veces más importante. Este estrés provocaría cambios en la pared vascular por redistribución y variación en la cantidad de MEC que puede alterar la integridad de la pared y favorecer su dilatación.

Esta teoría es apoyada por la mayor presencia de aneurismas en la aorta abdominal que en la aorta torácica. En la aorta abdominal existe menor cantidad de vasa-vasorum que nutren la pared, así como menor número de lámelas y una ratio mayor de colágeno / elastina, por lo que debe soportar una mayor tensión con una menor capacidad de respuesta ante el estrés. Además, la aorta infrarrenal experimenta una mayor resistencia periférica, un aumento de la presión de cizallamiento oscilatoria y un flujo reducido durante el reposo, lo que predispone a las enfermedades arteriales degenerativas. De hecho, la expresión de MMP-9 en la aorta infrarrenal murina es mayor que en la aorta torácica y, si llevamos a cabo la transposición de la aorta abdominal a la región torácica, esta expresión de MMP-9 se ve disminuida (91,92).

Asimismo, cuando un vaso se dilata, se genera un flujo turbulento y lento que, como vimos anteriormente, favorece la formación de TIL. Éste, a su vez, provoca un estado de hipoxia relativa de la pared, favorece la apoptosis de las CML, la elastolisis, por la activación de la plasmina y se perpetúa la inflamación por la activación plaquetaria. Pese a que este trombo puede reducir la tensión pico de la pared y su significado es aún incierto, la mayoría de estudios concluyen que favorece la progresión de la enfermedad y el riesgo de rotura de AAA con diámetro similar (42).

Estos factores físicos sumados a la disminución de nutrientes pueden favorecer cambios metabólicos que predispongan a la dilatación de la pared; no obstante, deben existir otras condiciones de la propia pared que jueguen un papel importante en su integridad.

### **2.3. Teoría actual.**

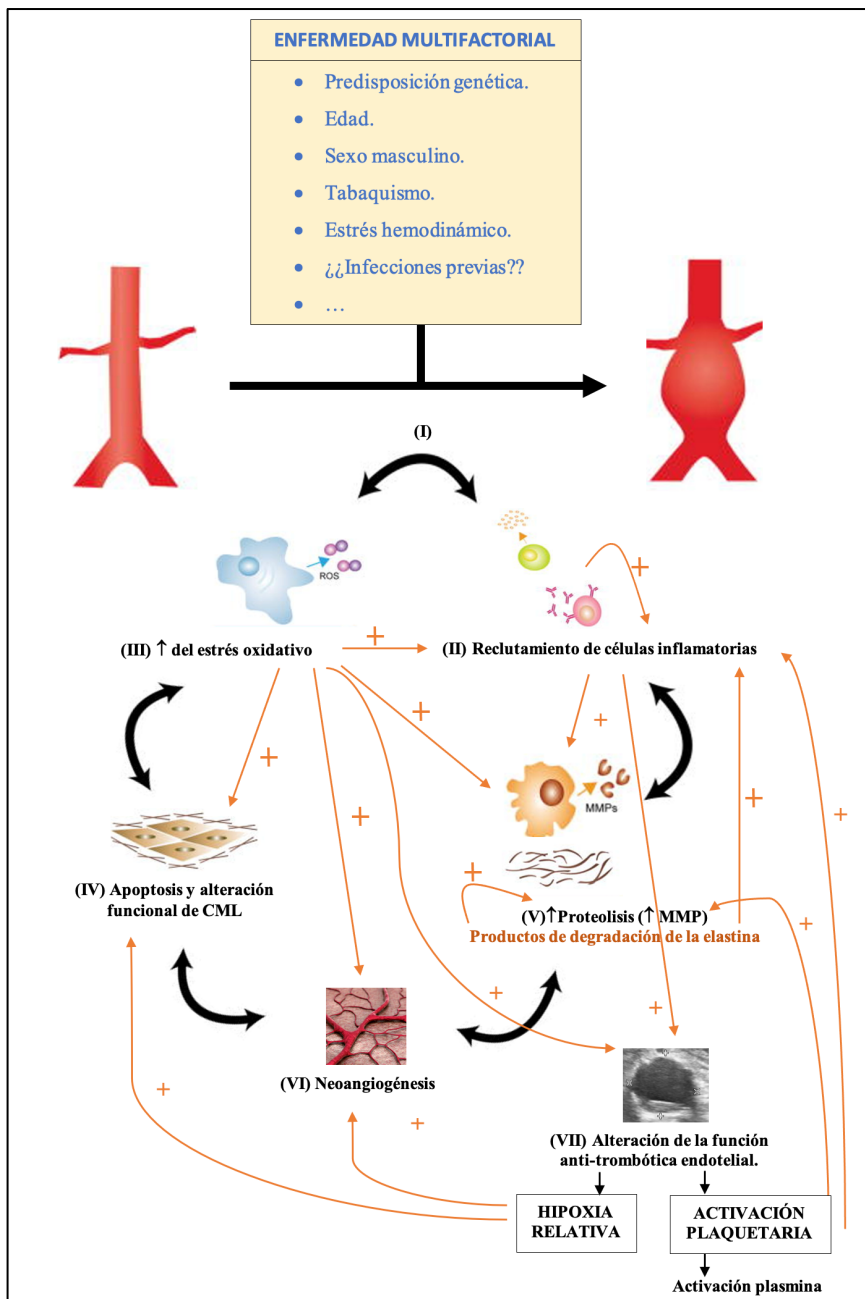
En los últimos años ha existido un gran avance en el conocimiento de los mecanismos

fisiológicos que llevan al desarrollo y progresión de los AAA. No obstante, existen aún muchas preguntas por resolver, no entendiéndose su patogenia de forma completa. Los datos actuales se basan principalmente en estudios sobre modelos animales experimentales y en el estudio histológico y molecular de muestras de AAA humanos obtenidas durante la intervención quirúrgica. Los resultados obtenidos en animales deben ser comparados con cautela puesto que en su etiopatogenia no han intervenido los principales factores de riesgo conocidos en humanos, como son la edad, la HTA o el tabaquismo (39). Asimismo, el estudio de las muestras aórticas sometidas a cirugía incluye AAA de tamaño considerable, no estando estudiadas las fases iniciales y medias de la enfermedad.

La degradación de la MEC de la capa media, la apoptosis de las CML, la inflamación y el estrés oxidativo son los pilares fundamentales que se conocen en la patogenia del AAA. Éstos, junto con la agregación plaquetaria y la activación de la cascada de la coagulación, favorecen la formación del TIL (89,93,94). No obstante, los detalles etiopatogénicos que inician, perduran y relacionan estos procesos moleculares, llevando al debilitamiento y dilatación de la pared vascular, no están totalmente claros. Probablemente la etiología sea multifactorial e incluya un sustrato genético (95) sobre el que inciden factores ambientales como el tabaquismo (65,96), las fuerzas mecánicas ejercidas contra la pared (97), la vascularización del vaso (91) y las propiedades inmunológicas parietales y sistémicas (98).

La figura 14 muestra de forma resumida un posible esquema sobre la relación entre los mecanismos implicados en el desarrollo y progresión del AAA.

**Figura 14. Esquema que ilustra la etiopatogenia del aneurisma de aorta abdominal (AAA) y las posibles relaciones entre los mecanismos implicados.** Probablemente el AAA sea una enfermedad multifactorial (I) en la que estén involucrados una susceptibilidad genética, factores ambientales y un componente inmunológico. Existe un reclutamiento de células inflamatorias de predominio en la adventicia (II); liberación de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS) (III) que favorecen la apoptosis de células musculares lisas (CML) (IV), que perdure la inflamación y (V) la actividad proteolítica. Los productos de degradación de elastina, a su vez, favorecen la actividad inflamatoria y proteolítica y perpetúan el proceso. A esta elastólisis inicial, se suma la degradación de colágeno y apoptosis de CML, principales formadoras de matriz extracelular (MEC), así como el desorden de la MEC sobrante y la menor capacidad funcional de las CML restantes, lo que debilita aún más la capa media. Este aumento de actividad proteolítica conduce a un ciclo perpetuo de inflamación y con ello mayor actividad proteolítica. Asimismo, (VI) algunas citoquinas promueven la neoangiogénesis. Además (VII) los ROS y la inflamación parietal van a alterar la función anti-trombótica endotelial con formación de trombo intraluminal, lo que genera un estado de hipoxia relativa que también favorece la apoptosis de CML y la neoangiogénesis. En el trombo, la activación plaquetaria promueve la inflamación y la proteólisis y activa la cascada de coagulación. *Fuente: producción propia.*



### 2.3.1. Aumento de la proteólisis: degradación de la matriz extracelular.

Una de las características histológicas fundamentales de la degeneración aneurismática es la pérdida de elastina de la capa media. Dada la estabilidad de esta molécula, con una durabilidad cuantificada en décadas, su pérdida es principalmente debida a un exceso de degradación. Así, en la pared vascular aneurismática existe un aumento de proteólisis de la MEC promovido por enzimas elastolíticas. Las familias de proteasas que juegan un papel fundamental en la progresión del AAA son las MMP y las serinproteasas (39).

Las MMP son esenciales para procesos fisiológicos homeostáticos como la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la remodelación tisular y ósea. Estas moléculas son liberadas como zimógeno, pro-MMP, por las CML y los fibroblastos de la pared vascular y por los neutrófilos y macrófagos del infiltrado inflamatorio. En condiciones normales existe una regulación multinivel, incluyendo la expresión genética y la activación extracelular del zimógeno. Los inhibidores tisulares de MMP (TIMP: *tisular inhibitor of MMP*) frenan su expresión y su activación, mientras que proteasas extracelulares como la plasmina, el activador del plasminógeno y otras MMP provocan la activación de las pro-MMP mediante un proceso de escisión enzimática (99).

En los AAA existe un aumento de los niveles de MMP, tanto a nivel plasmático, como en la pared aórtica, favoreciendo la degradación de la MEC y la debilidad de la pared vascular. Parece ser que tanto la MMP-2 (gelatinasa A) como la MMP-9 (gelatinasa B) deben estar necesariamente presentes para el desarrollo de un AAA, de forma que ratones knock-out para cualquiera de estas MMP no van a generar aneurismas (100). La MMP-2, liberada por las CML y los fibroblastos, es capaz de degradar la elastina y el colágeno tipo IV y es de gran

importancia en la degeneración aneurismática inicial, por su mayor concentración observada en AAA de pequeño tamaño (94). Por su parte, la MMP-9, generada principalmente por los macrófagos, pero también por las CML y los fibroblastos en condiciones pro-inflamatorias, escinde la elastina, los colágenos I y IV y el fibrinógeno. Múltiples estudios *in vitro* han demostrado que la MMP-9 es la principal enzima proteolítica producida por los tejidos aneurismáticos. Dentro de la búsqueda de marcadores de rotura, se ha estudiado que los niveles plasmáticos de MMP-9 no solo son mayores en pacientes con aneurismas, sino que se asocian a su tamaño y a su tasa de expansión (43). Otras MMP como la MMP-12 (elastasa macrofágica humana), enzima elastolítica más potente, implicada en el enfisema secundario al humo de tabaco, la MMP-1, la MMP-3, la MMP-8, la MMP-13 y la MMP-15 también parecen tener un papel en el desarrollo del AAA al causar degeneración de la MEC, favorecer la migración macrofágica y/o promover la angiogénesis (101,102).

Existen datos contradictorios en cuanto la expresión de TIMP en el AAA. En modelos animales deficientes en este gen se ha observado una mayor degeneración aneurismática (103,104). No obstante, tejidos aórticos obtenidos de AAA humanos muestran cifras elevadas de TIMP con respecto a aortas controles, pudiendo tratarse de un aumento compensatorio. En cualquier caso, existe un desbalance entre la actividad de las MMP y su inhibición a favor de la proteólisis, estando la relación MMP / TIMP aumentada en el AAA (94,105,106).

Dentro de las serín-proteasas, destacan la urokinasa (u-PA) y el activador tisular de plasminógeno (t-PA) que catalizan el paso del plasminógeno a su forma activa, la plasmina, otra serín-proteasa. También se incluye en este grupo la elastasa neutrofilica, con capacidad de degradar la MEC. La plasmina tiene la capacidad de actuar sobre la MEC de forma directa,

degradando las proteínas de adhesión de la MEC como son la fibronectina y fibrilina, o indirecta por activación de MMP; además, al igual que la elastasa neutrofílica, puede favorecer la muerte de las CML de la pared aneurismática (39,107,108).

Otras proteasas implicadas en la patogénesis del AAA, bien por destrucción directa de la MEC o por activación de MMP, son las cisteín-proteasas, observándose un aumento de catepsinas y una disminución de la cistatina C (inhibidor de las cisteín-proteasas formado por las CML) en las aortas aneurismáticas (109).

A su vez, los productos de degradación de la elastina favorecen el estado proinflamatorio por reclutamiento de células inflamatorias. Una vez producida la degradación y la fragmentación de elastina de la capa media, el colágeno es el mayor responsable de la resistencia de la aorta, siendo, en último término, su degradación lo que lleva a la rotura (110).

Se ha estudiado la inhibición de la proteólisis como diana terapéutica para frenar el desarrollo del AAA. La doxiciclina, un antibiótico del subtipo de las tetraciclinas, es capaz de inhibir varias MMP y ha demostrado una reducción en la degradación de elastina en modelos murinos. Sin embargo, en humanos no se han encontrado diferencias significativas en el crecimiento del AAA frente al grupo control (66–68).

### 2.3.2. Aumento de la apoptosis de células musculares lisas.

En la pared vascular aneurismática existe un menor número de CML en la capa media debido a un alto índice apoptótico, que se refleja por un exceso en la producción de p53 (111). No obstante, no se conoce con exactitud el desencadenante de la apoptosis, pudiendo

relacionarse con el estrés oxidativo y con el estado pro-inflamatorio. También pueden ser favorecidas por las serín-proteasas: plasmina y elastasa neutrofílica.

Por otra parte, como se comentó en la anatomía patológica del AAA, las CML se encargan en condiciones normales del remodelado del vaso mediante la producción de MEC y la expresión controlada de MMP y TIMP. Por lo tanto, al aumento de degradación de la elastina se suma una disminución en la formación de nueva MEC por encontrarse las CML en menor número y con menor capacidad proliferativa. Además, las CML bajo estímulos pro-inflamatorios son capaces de producir y liberar un exceso de MMP, ejerciendo un efecto directo sobre la progresión del AAA (112).

### 2.3.3. Aumento del infiltrado inflamatorio.

Junto con la pérdida de elastina y de CML de la capa media aórtica, otro hecho central es la aparición de un importante infiltrado inflamatorio transmural con predominio en la adventicia (85,113). Se trata de un infiltrado multicelular con mayor cantidad de macrófagos y linfocitos T, sobretodo CD4 (helper), y en menor medida linfocitos B (formando estructuras similares a folículos linfoides en la adventicia), linfocitos T CD8 +, polimorfonucleares (PMN), mastocitos, células dendríticas y natural killer (NK), existiendo interacciones entre ellas. Los macrófagos y PMN parecen tener un papel importante las fases iniciales (102). Existe, por tanto, un infiltrado multinuclear, secreción de inmunoglobulinas y producción de citoquinas, estando involucrado tanto el sistema inmune innato como el sistema inmune adaptativo (102,114). La tabla 2 muestra los subtipos de células T y de macrófagos que se han encontrado aumentados o disminuidos en los estudios con muestras de AAA humanos y en animales experimentales.

**Tabla 2. Subtipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos observados en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) humanos y en los tres tipos de modelos de animales experimentales.** Las células Th1 son proinflamatorias, aumentado el reclutamiento celular y la activación de macrófagos. Las células Th2 se consideran anti-inflamatorias y limitan la citotoxicidad macrofágica y las metaloproteasas, pero pueden favorecer la apoptosis de las células musculares lisas. Aunque existen resultados contradictorios con respecto a las Th2 parecen estar aumentadas en el AAA y se sabe que juegan un papel en la degeneración parietal. Las Th17 se encargan de favorecer el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos y favorecen el estrés oxidativo. Las células Treg limitan la liberación de citoquinas proinflamatorias por otros subtipos y por macrófagos y eliminan las células T autoinmunes. En cuanto a los subtipos de macrófagos, la diferenciación a M1 por interferón- $\gamma$  y lipopolisacáridos generan citoquinas proinflamatorias promoviendo la dilatación aórtica y el remodelado de la pared vascular. En cuanto al subtipo M2, se induce por citoquinas Th23 como IL-4 e IL-13 y van a regular el reclutamiento de células inflamatorias, la angiogénesis y el depósito de colágeno. Ambas se encuentran aumentadas en el AAA, los M1 sobre todo al inicio y los M2 según avanza la enfermedad, posiblemente como mecanismo compensatorio. *Fuente: Adaptado de Dale MA, et al. Inflammatory Cell Phenotypes in Abdominal Aortic Aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(8):1746-1755.*

	Th1	Th2	Th17	T <sub>reg</sub>
AAA humano	Aumentado	Contradictorio	Aumentado	Disminuido
Modelo ApoE <sup>-/-</sup> AngII	Aumentado	Aumentado	Aumentado	Disminuido
Modelo CaCl <sub>2</sub>	Aumentado	-	-	-
Modelo perf-elastasa	-	-	Aumentado	-

	M1	M2
AAA humano	Aumentado	Aumentado
Modelo ApoE <sup>-/-</sup> AngII	Aumentado	Aumentado
Modelo CaCl <sub>2</sub>	Aumentado	-
Modelo perf-elastasa	Aumentado	-

Estas células inflamatorias son capaces de perpetuar la respuesta inmune por liberación de citoquinas pro-inflamatorias (115), son una de las fuentes principales de ROS (que a su vez favorecen el estado proinflamatorio (114)), y de MMP, favoreciendo la destrucción de la MEC y la apoptosis y cambio morfológico de las CML. Además, el metabolismo de los fosfolípidos y la hipoxia relativa causada por el TIL promueven la angiogénesis por la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial (VEGF: *vascular endothelial growth factor*) y el transformador del factor de crecimiento beta (TGF- $\beta$ : *transforming growth factor-beta*) en macrófagos y CML (39).

Numerosos estudios han identificado múltiples citoquinas pro y anti-inflamatorias que se encuentran elevadas en los AAA, y que probablemente estén implicadas en la formación aneurismática, pero aún no se conoce completamente la contribución de cada una de ellas (101). Los estudios moleculares a través de biopsias de AAA así como el estudio de citoquinas circulantes han mostrado resultados discordantes, en unos casos con un predominio de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), mientras que en otros lo hacen las del tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) (115).

No obstante, no se conoce si los productos de degradación de la elastina o los ROS son los que inicialmente estimulan la llegada y activación de estas células inflamatorias o si es la propia reacción inflamatoria el factor inicial desencadenante de la degeneración parietal, siendo el aneurisma similar a una enfermedad inflamatoria crónica. En este segundo supuesto, el inicio inflamatorio puede deberse a una susceptibilidad genética del paciente, o bien a que se trate de un fenómeno de autoinmunidad por alteración de los mecanismos inmunorreguladores o por mimetismo antigénico con un factor ambiental o un microorganismo como *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, Citomegalovirus, virus herpes simple o *Borrelia burgdorferi* (14,116) que generaría una respuesta inmune específica contra la pared aórtica. Sí existe evidencia sobre la implicación de la autoinmunidad en la patogénesis del AAA, por la presencia de autoanticuerpos y linfocitos T oligoclonales en pacientes con AAA (113) y por existir una reducción en la tasa de expansión aneurismática en modelos animales tratados con fármacos inmunosupresores (117,118) (aunque no en humanos). La disminución de los linfocitos Treg observada en los AAA también puede influir en la formación de linfocitos T oligoclonales autoreactivos (114,115). La susceptibilidad genética parece jugar un papel importante ya que

se ha analizado la expresión génica en aortas sanas y con AAA y se ha observado una diferencia en la expresión de 3000 genes, interpretándose que factores ambientales y fuerzas biomecánicas podrían modificar la expresión de algunos genes, entre otros los relacionados con la respuesta inmune (119).

#### 2.3.4. Papel del estrés oxidativo en el aneurisma de aorta abdominal.

Estudios clínicos e investigaciones experimentales sugieren la implicación del estrés oxidativo como pieza clave en la patogenia del AAA, existiendo una producción de ROS y radicales libres (RL) que excede la capacidad antioxidante de control celular (120). De esta forma, existe un acúmulo de ROS y RL por desbalance entre las fuentes endógenas productoras, como la NADPH oxidasa, la mieloperoxidasa, la xantina oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la hemo-oxigenasa y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y las enzimas reductoras, como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, la superóxido dismutasa, la tiorredoxina y la catalasa. Este acúmulo de ROS y RL desencadena una respuesta proinflamatoria y puede relacionarse con la apoptosis celular.

La principal fuente de ROS en los AAA es la NADPH oxidasa, siendo otras fuentes importantes las procedentes de los neutrófilos (NADPH oxidasa y mieloperoxidasa) y las producidas por la reducción del hierro contenido en los eritrocitos del TIL (121,122).

En estudios histológicos, los niveles de ROS en muestras de aorta aneurismática se han observado 2.5 veces superiores a las muestras de aorta adyacente no dilatada, encontrándose también elevadas la expresión y la actividad de las subunidades de la NADPH oxidasa (121).

En el reciente estudio de *Moñux et al.* (122), se observó un aumento de la expresión de las subunidades gp67-phox de la NADPH oxidasa citosólica y de la gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial. Asimismo, modelos experimentales de ratones con menor producción de ROS o en los que se elimina la subunidad p47 de la NADPH oxidasa tienen menor tendencia a la degeneración aneurismática (101,120).

Los ROS son moléculas con una elevada reactividad que causan la degradación de la MEC por activación de MMP, incluyendo la MMP-2 y la MMP-9, y promueven la apoptosis de CML (por oxidación de lípidos, proteínas, azúcares y ácidos nucleicos que causan daño en el ADN). Además, favorecen la disfunción mitocondrial y el reclutamiento de células proinflamatorias (las cuales son a su vez una importante fuente de ROS). Por último, las proteínas oxidadas pueden funcionar como neoantígenos promoviendo una reacción autoinmune (39,123).

Intervenciones farmacológicas a este nivel, como la utilización de vitamina E, con efecto anti-oxidante, o el bloqueo de la NADPH oxidasa o la iNOS, han demostrado beneficios en estudios *in vitro* y sobre modelos animales, no obstante, no han demostrado actualmente efectividad clínica en humanos (123,124).

### 2.3.5. Papel del trombo intraluminal en el aneurisma de aorta abdominal.

El flujo turbulento que se produce en las dilataciones aneurismáticas, junto a la producción de ROS por las células endoteliales con pérdida de las propiedades antitrombóticas, favorecen la aparición de TIL, presente en el 75% de los AAA (43). El daño endotelial expone al torrente sanguíneo el colágeno subendotelial que, por unión al factor de

von Willebrand, permite la adhesión plaquetaria por unión a sus glicoproteínas de membrana y su activación. Asimismo, la exposición del factor tisular (FT) activa la cascada de la coagulación con la formación final de un trombo estable (125).

Pese a que algunos estudios han postulado que, según análisis geométricos ideales, el TIL podría proteger de la progresión de la enfermedad por disminución del estrés parietal, se ha demostrado que el TIL influye en la debilidad de la pared, siendo la aorta subyacente a regiones con TIL más débil. Actualmente, se considera que el TIL es un factor de riesgo de crecimiento y rotura del AAA (27,41,126–128). Confirmando estos hallazgos, el estudio molecular muestra una relación entre el volumen de trombo en los AAA y una mayor concentración de células inflamatorias, citoquinas, MMP, elastasa y plasmina, favoreciéndose la proteólisis y funcionando como factor de riesgo de progresión (127). Además, el estudio histológico de la pared de AAA con TIL muestra una disminución del grosor parietal, una disminución de la elastina, que se encuentra más fragmentada, un aumento de células inflamatorias y una disminución de CML por aumento de apoptosis mediada por linfocitos T CD8. Todo ello, pone en riesgo la integridad de la pared, siendo el TIL un factor de riesgo de rotura (41). En esta línea, estudios clínicos también han reportado la correlación existente entre el grosor del TIL y el diámetro aneurismático, los niveles de MMP, la degradación de elastina y la apoptosis de las CML (128).

La estructura del TIL no es homogénea, sino que se caracteriza por una morfología tricapa: la región luminal en contacto con el torrente sanguíneo, la intermedia y la abluminal, próxima a la pared aórtica. En la región luminal se recluta fibrinógeno, neutrófilos, plaquetas, y eritrocitos lisados. En las capas intermedia y abluminal no existen componentes celulares y

se encuentra muy activa la fibrinólisis.

La activación plaquetaria perpetúa la inflamación y activa la formación de plasmina, una proteasa capaz de inducir la proteólisis de forma directa por destrucción de las moléculas de adhesión de la MEC y de forma indirecta por activación de las MMP. Esta proteasa, y las liberadas por el resto de los componentes celulares del TIL (como la mieloperoxidasa y la elastasa neutrofilica) van a favorecer la degradación de la MEC. Este entorno proteolítico, sumado al estrés oxidativo por la liberación de hierro y mieloperoxidasa de eritrocitos y leucocitos, hacen desaparecer las células endoteliales y la íntima subyacente al TIL (39,125,128). Además, los ROS generados también son capaces de activar las MMP y de provocar apoptosis de las CML. Por otro lado, la presencia de TIL impide la difusión de oxígeno a la capa media, generando un estado de hipoxia relativa (41,42) que favorece la neovascularización y la llegada de células inflamatorias. Además, las células mesenquimales, los macrófagos y los fibroblastos, bajo condiciones de hipoxia, disminuyen la formación de MEC e inducen la elastólisis y la apoptosis de las CML. Incluso, se ha especulado que pueda modificar las vías metabólicas energéticas de producción de adenosín trifosfato (ATP) a favor de vías anaeróbicas, frente al metabolismo aerobio predominante en la pared aórtica sana (27,42,129). De esta forma, el TIL se considera biológicamente activo ya que la sangre circulante renueva de forma permanente los componentes de la región luminal y por actuar como fuente de secreción de proteasas, de citoquinas proinflamatorias y de productos de degradación de la fibrina (125). En resumen, esta actividad proteolítica y oxidativa del TIL favorecen la degradación de la MEC, la apoptosis de CML y la activación de la respuesta inmune.

### **3. HEMOSTASIA, FIBRINOLISIS, FACTOR XA Y RIVAROXABÁN.**

#### **3.1. Hemostasia**

El término hemostasia se define como la detención de la hemorragia. Cuando se produce un daño sobre un vaso sanguíneo existen 3 mecanismos fisiológicos que se desarrollan consecutivamente: 1) la vasoconstricción refleja del vaso, 2) la formación del tapón plaquetario o hemostasia primaria y 3) la formación del coágulo sanguíneo o hemostasia secundaria.

##### 3.1.1. Vasoconstricción refleja.

De forma inmediata, la lesión de un vaso provoca la contracción transitoria de las fibras musculares de la pared disminuyendo el diámetro del vaso con el fin de minimizar la pérdida sanguínea. Esta contracción se consigue por la activación del sistema nervioso simpático que inerva las CML y por la liberación de mediadores locales como la endotelina y el tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) por los tejidos traumatizados y las plaquetas. Este espasmo es mayor cuanto mayor es el traumatismo y dura muchos minutos o incluso horas, mientras tiene lugar la hemostasia.

##### 3.1.2. Hemostasia primaria.

Consiste en la formación de un tapón plaquetario. Las plaquetas, debido a las glicoproteínas que presentan en su pared celular y a las propiedades anti-trombóticas del endotelio, no se adhieren al endotelio intacto. Pero cuando el vaso se daña, el colágeno subendotelial queda expuesto y las plaquetas van a adherirse al mismo por unión de sus glicoproteínas al factor de von Willebrand presente en el plasma. Esta unión va a desencadenar un cambio morfológico en las plaquetas conocido como activación plaquetaria, pasando de ser discos ovalados a tener una superficie irregular y con pseudópodos que aumentan su

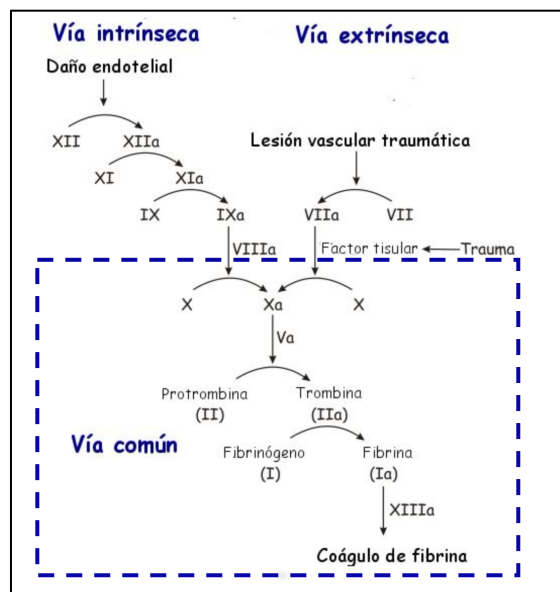
superficie. Se activan sus proteínas contráctiles para la liberación de los gránulos plaquetarios que contienen varios factores de coagulación, TxA<sub>2</sub>, ATP, serotonina, histamina y calcio, entre otros. Estas sustancias van a facilitar la activación de plaquetas cercanas y, por tanto, la agregación plaquetaria formando el llamado trombo primario, de plaquetas y colágeno. En caso de pequeños desgarros, este tapón es suficiente para detener la hemorragia; en caso contrario, las propias plaquetas facilitan el inicio de la siguiente fase, la hemostasia secundaria.

### 3.1.3. Hemostasia secundaria.

La hemostasia secundaria se inicia entre 15 y 120 segundos tras el daño vascular siendo activado por sustancias liberadas por el vaso lesionado y por las plaquetas activadas. Se trata de un proceso enzimático, resumido en la figura 15, que concluye en la formación del coágulo sanguíneo o trombo secundario. La coagulación tiene lugar en 3 etapas: 1) la formación del activador de la protrombina, 2) la conversión de protrombina en trombina y 3) el paso de fibrinógeno a fibras de fibrina.

**Figura 15. Esquema de la cascada de la coagulación o hemostasia secundaria.**

Fuente: <http://www.sedatio.es/nuevos-anticoagulantes-ii/cascada-coagulacion>.



El activador de la protrombina se considera que se forma por dos vías, la extrínseca y la intrínseca, aunque interactúan constantemente. En ellas intervienen diferentes factores de coagulación que son, en su mayoría, enzimas plasmáticas inactivas que se activan en reacciones sucesivas formando la cascada de la coagulación que converge en la formación del factor X activado (FXa). Este FXa junto con su cofactor, el factor V activado, calcio y fosfolípidos constituyen el llamado complejo de activación de la protrombina, siendo su formación el factor limitante de la coagulación sanguínea.

El activador de la protrombina en presencia de suficiente calcio convierte la protrombina o factor II (proteína plasmática sintetizada en el hígado requiriendo vitamina K) en trombina (factor II activado).

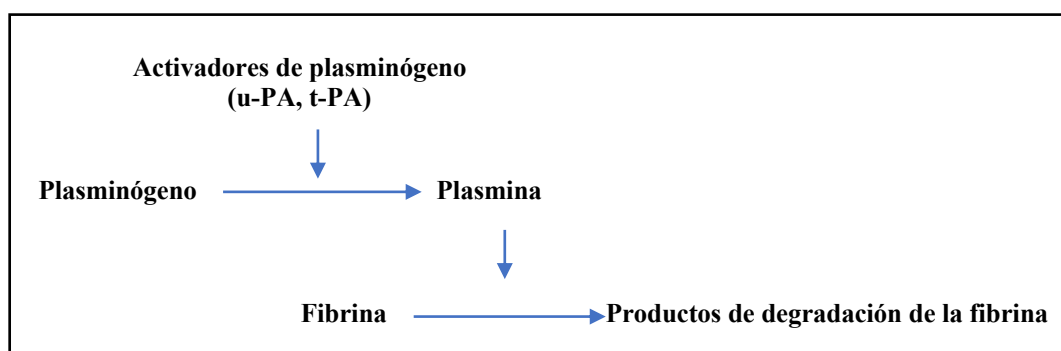
Por último, la trombina es una serín-proteasa que va a escindir el fibrinógeno circulante en fibras insolubles de fibrina con capacidad automática para polimerizar. Las uniones de estas fibras son débiles precisando de la activación del factor estabilizador de la fibrina o factor XIII por la trombina para la formación de los fuertes enlaces covalentes. Así, el trombo secundario o coágulo sanguíneo se compone de una red de fibras de fibrina en todas las direcciones que atrapan plaquetas, eritrocitos y plasma (130,131).

### **3.2. Fibrinolisis**

La fibrinolisis es un sistema que se activa de forma paralela a la cascada de coagulación con el objetivo de limitar el tamaño del trombo, así como para su disolución y lisis una vez resuelto el daño vascular. Se trata de un proceso enzimático por el que la fibrina se disuelve en productos de degradación de la fibrina por la serín-proteasa plasmina. La activación del

plasminógeno en plasmina se lleva a cabo por los activadores de plasminógeno tipo tisular (t-PA) y tipo uroquinasa (u-PA) (Figura 16). Estos se liberan por el endotelio en el momento del daño vascular, pero su efecto es mucho más lento, para equilibrar la acción hemostática. El D-dímero se produce por la digestión de estas uniones de fibrina, siendo un indicador de fibrinolisis con valor en el diagnóstico de la enfermedad tromboembólica venosa y la coagulopatía intravascular diseminada y con elevación en pacientes con AAA (130,131).

**Figura 16. Esquema de la fibrinolisis.** Fuente: producción propia.



### 3.3. Factor Xa y sus funciones en la pared vascular.

El factor X de la coagulación o factor de Stuart-Prower es una serín-proteasa de síntesis principalmente hepática y dependiente de vitamina K. Circula como zimógeno inactivo y, a través de la vía intrínseca o extrínseca, se convierte en su forma activa. Asimismo, también puede ser activado por la catepsina G cuando se une al receptor MAC-1 de los monocitos.

Como se ha desarrollado anteriormente, el FXa juega un papel central en la formación del coágulo mediante la activación de protrombina a trombina, siendo la mayor fuente protrombótica en el trombo (132). No obstante, además de su función en la coagulación, diversos estudios han documentado otros efectos pro-inflamatorios y proteolíticos sobre la pared vascular. Estos efectos se ha demostrado que son independientes a la activación de la

protrombina y que se encuentran mediados por los receptores de proteasas activadas (PAR), concretamente la PAR-1 y PAR-2, presentes en células endoteliales, CML y fibroblastos (132). De este modo, la activación del FX durante la hemostasia, por daños tisulares o inflamación, puede jugar un papel patogénico en el desarrollo de enfermedades vasculares.

En los diferentes estudios se ha objetivado que el FXa provoca un aumento de la proliferación linfocítica y una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y proteína quimiotáctica de los monocitos) por las células endoteliales y de VEGF por fibroblastos promoviendo la angiogénesis (132–134). En este sentido, Hara et al. (135) evidenciaron que la inhibición del FXa en modelos murinos ejercía un efecto protector sobre la progresión de la placa aterosclerótica por reducción de la activación de macrófagos proinflamatorios. Ha sido también demostrado que el FXa es capaz de modificar la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en las CML de la pared de venas safenas (136). Además, en arterias femorales de pacientes diabéticos, el FXa promueve cambios en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo energético, en concreto con la glucólisis, lo que sugiere que el FXa puede alterar el metabolismo mitocondrial lo que se acompaña con un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (137).

En cuanto a los AAA, también los estudios sugieren la colaboración del FXa en su patogenia. El reciente estudio de Moñux G et al. (122) sugiere que el FXa contribuye en la patogénesis de los AAA al crear un estado pro-inflamatorio y generar un exceso de estrés oxidativo en la pared vascular por aumento de la expresión de la NADPH oxidasa citosólica y mitocondrial, efectos que se ven revertidos con la inhibición del FXa. En estudios

experimentales sobre ratones Apo E<sup>-/-</sup> infundidos con angiotensina, también se objetivó un efecto protector sobre el desarrollo o severidad de los AAA si se inhibía el FXa (138).

### **3.4. Hemostasia, fibrinólisis y FXa en el aneurisma de aorta abdominal.**

Como se ha expuesto en el apartado de patogenia, el TIL presente en la mayoría de AAA se considera factor de riesgo en la progresión de la enfermedad aneurismática por los mecanismos descritos. En dicho TIL existen niveles aumentados de factores de la coagulación. Asimismo, la activación plaquetaria que se produce en el TIL es una fuente importante de FXa, por lo que las células de la pared vascular se encuentran expuestas de forma crónica a concentraciones aumentadas de este factor (122,139,140).

### **3.5. Rivaroxabán**

#### 3.5.1. Descripción y mecanismo de acción.

El rivaroxabán (BAY 59-7939) es un fármaco que se une de forma altamente selectiva al FXa ejerciendo una inhibición directa, competitiva y dosis dependiente del mismo. Su inhibición es ejercida sobre el FXa libre, el unido al complejo activador de protrombina e incluso el que forma parte del coágulo. Se realiza por unión directa con el FXa, sin ser mediado por otros cofactores como la anti-trombina III, como sí ocurre en el caso de las heparinas y el fondaparinux. Además de su efecto anticoagulante, diversos estudios han mostrado un efecto protector sobre la pared vascular que parece derivar de la modulación de la inflamación y el estrés oxidativo (122,137,138).

#### 3.5.2. Farmacocinética.

Presenta una buena biodisponibilidad oral (entre un 80 y un 100%), con un rápido

inicio de acción, alcanzando concentraciones máximas a las 2 – 4 horas. En cuanto a su distribución, presenta una unión a proteínas plasmáticas del 92 – 95%, principalmente a la albúmina sérica. Su vida media es de entre 5 y 9 horas, aunque puede ser mayor en pacientes de edad avanzada. Dos tercios son metabolizados por la vía del citocromo (CYP3A4 y CYP2J2) y otras vías independientes y es excretado en forma de metabolitos inactivos por orina y heces. El tercio restante (en torno a un 36%) es excretado sin cambios en orina, predominantemente por secreción tubular (141–143).

### 3.5.3. Indicaciones terapéuticas

Es un anticoagulante oral eficaz en la prevención y tratamiento de las trombosis venosas y arteriales. Actualmente las indicaciones aprobadas por la Agencia Europea del Medicamento son las mostradas a continuación (142):

- Tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa (EDEV), incluyendo la trombosis venosa profunda y el tromboembolismo pulmonar, y prevención de recurrencias de la EDEV.
- Prevención de la EDEV tras cirugía de ortopédica de prótesis de cadera o rodilla.
- Prevención de ictus de etiología embólica y embolismos sistémicos en pacientes con fibrilación auricular no valvular y uno o más factores de riesgo incluyendo insuficiencia cardíaca, HTA, edad mayor o igual a 75 años, diabetes o antecedentes de ictus o ataque isquémico transitorio.
- Prevención de eventos aterotrombóticos tras un síndrome coronario agudo (asociado a medicación antiagregante).
- Prevención de eventos aterotrombóticos en pacientes con alto riesgo de eventos isquémicos por enfermedad coronaria o isquemia periférica (asociado a antiagregante).

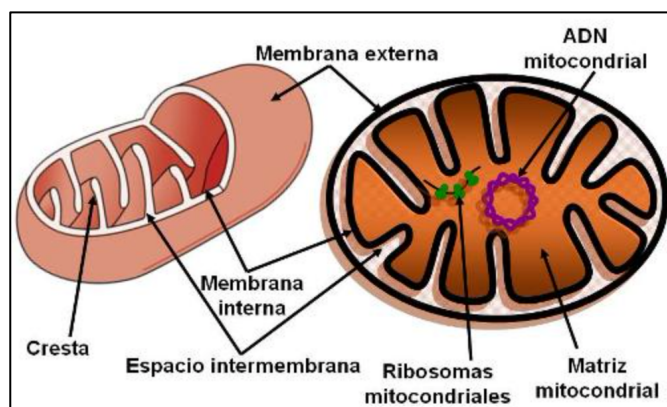
## 4. BIOGÉNESIS, FUNCIONALIDAD Y DINÁMICA MITOCONDRIAL.

### 4.1. La mitocondria como organela celular.

La mitocondria es una organela derivada de una  $\alpha$ -protobacteria que fue fagocitada por la célula eucariota produciéndose una simbiosis entre ambos tipos celulares (144). Su estructura consiste en dos membranas bicapa lipídica-proteica formando la membrana externa (OMM: *outer mitochondrial membrane*) y la interna (IMM: *inner mitochondrial membrane*) con un espacio intermembrana entre ambas (IMS: *intermembrane space*). La IMM forma crestas o invaginaciones hacia el interior en las que se disponen las enzimas oxidativas. En el interior existe una matriz con grandes cantidades de enzimas. Posee su propio genoma circular con 37 genes que codifican 13 proteínas de la cadena respiratoria, así como 22 tRNAs y 2 rRNAs relacionados con la traducción de su genoma (figura 17). Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas mitocondriales (> 1000) están codificadas en el ADN nuclear y son sintetizadas en ribosomas citosólicos e importadas a la organela por los transportadores de la membrana externa e interna (TOM y TIM: *translocase of outer and inner membrane*). Se requiere una exquisita coordinación entre ambos genomas para una correcta función mitocondrial.

**Figura 17. Esquema de la estructura mitocondrial.**

Fuente: tomado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1636541018914285>



Su función es esencial en las células eucariotas para la producción energética mediante la fosforilación oxidativa, el metabolismo de nucleótidos, aminoácidos, lípidos y cofactores, la homeostasis del calcio y la apoptosis celular (131,145).

La energía liberada por las reacciones oxidativas de la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos se emplea fundamentalmente para sintetizar una sustancia de alta energía denominada ATP, el cual se difundirá por toda la célula para liberar su energía donde sea necesaria. Su papel fundamental en la producción energética expone a la mitocondria a altas cantidades de ROS, generadas principalmente en el ciclo de Krebs, la cadena transportadora de electrones y la  $\beta$ -oxidación. Un exceso de ROS puede alterar la estructura de las proteínas y causar mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt). Este hecho y la necesidad de una exquisita coordinación entre ambos genomas, hace imprescindible la presencia de mecanismos de control de calidad mitocondrial que permita eliminar mitocondrias disfuncionantes mediante una forma de autofagia mitocondrial, denominada mitofagia; y el recambio mitocondrial con eliminación de componentes dañados por un lado y adición de nuevas proteínas y/o lípidos en un proceso de biogénesis mitocondrial. Ambos procesos opuestos se encuentran equilibrados en condiciones fisiológicas para mantener una masa mitocondrial funcionante (144).

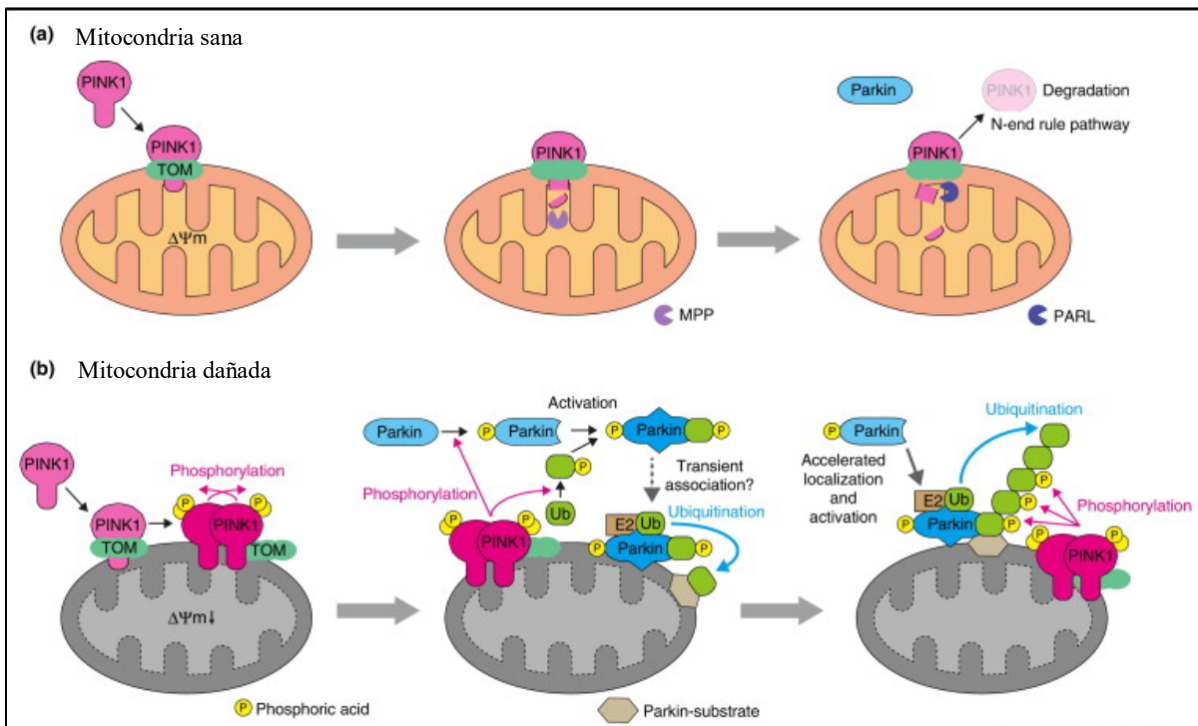
#### **4.2. Mitofagia**

La mitofagia se refiere al proceso de degradación de las mitocondrias dañadas en los lisosomas y resulta esencial en el mantenimiento de la calidad mitocondrial para evitar un acúmulo de mitocondrias tóxicas, con exceso de ROS, que puedan llevar a un estado pro-inflamatorio y a la muerte celular.

Es promovida por la vía de PINK1-Parkin. La parkin es una proteína citosólica del tipo E3 ubiquitina ligasa que en condiciones normales se encuentra en el citosol. La kinasa putativa inducida por PTEN (PINK1) es una serín-kinasa que, gracias al potencial transmembrana mitocondrial es translocada por el complejo TOM/TIM a la IMM de la mitocondria donde es degradada parcialmente por la peptidasa MPP y la proteasa PARL. El PINK1 inactivo restante es liberado al citosol y degradado por el proteosoma.

En la disfunción mitocondrial, existe una pérdida del potencial de membrana mitocondrial que impide la translocación de PINK1 a la IMM, quedando expuesto en la superficie mitocondrial unido a TOM. Allí, PINK1 dimeriza y se activa mediante autofosforilación. A continuación, PINK1 activo fosforila la parkin y la ubiquitina. La parkin P-Ser65 sufre un cambio conformacional y se une a la fosfo-ubiquitina, lo que activa su función y permite su unión a la mitocondria. En la OMM va a ubiquitinar múltiples proteínas marcando la mitocondria como dañada. Asimismo, PINK1 fosforila estos residuos ubiquitinizados atrayendo más parkin, produciéndose una realimentación que amplifica la señal (figura 18). Las proteínas receptoras de la autofagia se unen a los dominios fosfo-ubiquitinados y la mitocondria es rodeada por una doble membrana formando el autofagosoma, que será degradado por lisosomas (145–149).

**Figura 18. Esquema de la mitofagia.** Comportamiento de PINK1-Parkin en la mitocondria sana (a) y en la disfuncionante (b) por disminución del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Fuente: tomado de Eiyama A. et al. *PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells. Curr Opin Cell Biol. 2015 Apr;33:95-101.*



### 4.3. Biogénesis mitocondrial.

La antítesis de la mitofagia es la biogénesis mitocondrial. El tipo de tejido y su demanda energética es el principal determinante del volumen mitocondrial (144). El aumento del volumen mitocondrial va a requerir de una adecuada coordinación de la red mitocondrial existente y de la actuación sincronizada entre el genoma nuclear y el mitocondrial. Se trata, por tanto, de un proceso complejo y altamente regulado que incluye la transcripción y traducción de ADNmt, la traducción de transcritos derivados del núcleo, el reclutamiento de proteínas y lípidos recién sintetizados, la importación mitocondrial y el ensamblaje de productos mitocondriales y derivados nucleares en un retículo mitocondrial en expansión. La regulación espacio-temporal se logra mediante la activación de varios factores de transcripción, en respuesta a diversos estímulos, como la disponibilidad de nutrientes,

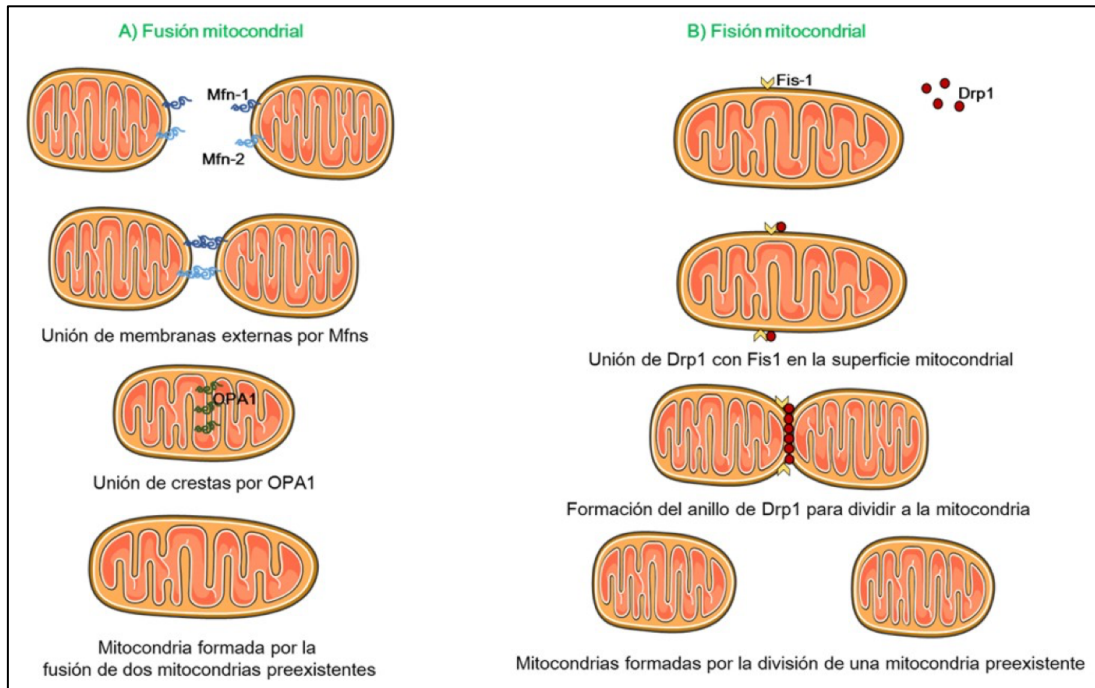
hormonas, factores de crecimiento y fluctuaciones de temperatura. Los principales factores de transcripción son: los factores respiratorios nucleares 1 y 2 (NRF1 Y NRF2), los receptores relacionados con el estrógeno, el factor A de transcripción mitocondrial (TFAM) y el coactivador del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas 1-alfa (PCG1 $\alpha$ ). El NRF1 y NRF2 regulan la expresión de múltiples proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo. El TFAM es una proteína sintetizada en el núcleo, requerida para la transcripción de proteínas mitocondriales nucleares y para la replicación del ADNmt. Por su parte el PCG1 $\alpha$  induce la biogénesis al estimular la expresión de NRF1 y NRF2 siendo su expresión un indicador de función mitocondrial (144). De hecho, un aumento en la expresión de PCG1 $\alpha$  aumenta la expresión de genes mitocondriales relacionados con la fosforilación oxidativa, como la citocromo C oxidasa (COX) (150). Además, la biogénesis mitocondrial también es regulada a nivel postraducciona. Recientemente, se encontró que el complejo TOM es fosforilado por cinasas citosólicas como la caseína quinasa 1 y 2 y la proteína quinasa A que promueve o inhibe la importación mitocondrial y afecta a la biogénesis mitocondrial.

#### **4.4. Fusión y fisión mitocondrial.**

La mitocondria es una organela dinámica y el balance entre la fisión (división de una mitocondria en dos o más organelas) y su proceso contrario, la fusión, regula la expansión y morfología de la red mitocondrial y sirve también para la reparación de sus componentes. Estos procesos son controlados por GTPasas, interviniendo las mitofusinas (Mfn1, Mfn2) y la proteína relacionada con la atrofia óptica 1 (OPA1) en la fusión, mientras que Drp1 (Drp1: *Dynamin-related protein 1*) es la proteína citosólica que se encarga de regular la fisión por su unión a la proteína de la OMM Fis1. También participan en la fisión las proteínas MFF y MiD49/51 (figura 19).

**Figura 19. Procesos de fisión y fusión mitocondrial.**

Fuente: [http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/555\\_cienciorama.pdf](http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/555_cienciorama.pdf)



La fusión se produce en dos fases, la unión de la OMM es mediada por Mfn1 y Mfn2; y la de la IMM por OPA-1. Este último paso requiere que se mantenga el potencial transmembrana generado por la cadena transportadora de electrones, de forma que su pérdida inhibiría la fusión.

La fisión o división mitocondrial se lleva a cabo previa repartición de sus componentes. Además, este proceso también se utiliza para apartar selectivamente contenido dañado en una mitocondria que irá a mitofagia y componentes sanos en la otra. Diferentes modificaciones postraduccionales pueden modular la actividad de Drp1; en concreto la fosforilación en Ser637 provoca una disminución de su actividad GTPasa, manteniendo a Drp1 en el citosol e impidiendo la fisión mitocondrial (149,151). La depolarización de la membrana mitocondrial va a producir un aumento del calcio intracelular que activa la fosfatasa calcineurina

produciendo la defosforilación de Drp1 y su translocación a la mitocondria favoreciendo la fisión. Así, la quelación del calcio intracelular o la inhibición de la fosfatasa se ha demostrado que bloquean la fisión dependiente de Drp1 (152,153).

#### **4.5. Homeostasis mitocondrial.**

El mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, entendida como el balance entre fisión y fusión mitocondrial, la génesis de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) y la eliminación de aquellas dañadas (mitofagia), es esencial para el mantenimiento de la salud tisular. La activación de la biogénesis mitocondrial tiene efectos beneficiosos en las células y organismos envejecidos. Por su parte, la mitofagia es un mecanismo de protección celular en respuesta al estrés. No obstante, debe existir un perfecto equilibrio entre la síntesis de nuevas mitocondrias y la desaparición de las mitocondrias viejas o dañadas para controlar la masa y la calidad mitocondrial y permitir la adaptación celular a las demandas energéticas y al estrés celular.

Un desbalance entre estos procesos que aseguran la calidad mitocondrial, tiene como consecuencia el acúmulo de mitocondrias aberrantes, un aumento de consumo de oxígeno y la generación de ROS que, en exceso, llevan al estrés oxidativo y a la muerte celular. Además, la acumulación de mitocondrias disfuncionales se ha asociado con una reducción de la mitofagia, por lo que existiría un mayor acúmulo de mitocondrias dañadas (154).

#### **4.6. Disfunción mitocondrial en la enfermedad aneurismática.**

La funcionalidad de la mitocondria resulta crítica para el mantenimiento de la integridad y la supervivencia celular, de forma que su alteración se ha visto implicada en numerosas

enfermedades incluyendo enfermedades neurodegenerativas, síndrome metabólico, miopatías, diabetes y cáncer (146,147). Las mitocondrias resultan esenciales para la formación de ATP a través de la cadena respiratoria del metabolismo aerobio. Alteraciones del metabolismo mitocondrial conducen a la disfunción mitocondrial implicada en el envejecimiento vascular normal y en enfermedades cardiovasculares relacionadas con la edad, incluyendo la aterosclerosis y los AAA (155,156).

Existe una evidencia creciente que relaciona el daño en las funciones mitocondriales con el desarrollo de AAA, tanto en modelos animales como en humanos. Estas alteraciones incluyen el aumento en la producción de ROS mitocondriales, modificaciones en la homeostasis mitocondrial y un exceso de apoptosis de las CML de la pared aórtica dependiente de las mitocondrias (157).

El estrés oxidativo puede promover a varios niveles la patogénesis del AAA, como se ha expuesto en anteriores apartados. Pero, además, puede causar mayor daño mitocondrial, al favorecer las mutaciones en el ADNmt, lo que puede llevar a una disfunción en la cadena respiratoria con disminución en la producción de ATP. Esta caída de ATP mitocondrial, principal fuente de energía celular, provoca un mayor estrés oxidativo.

Confirmando estos hallazgos, estudios en modelos experimentales y en muestras obtenidas de AAA humanos muestran una disminución en la expresión de genes (PGC1 $\alpha$ , ATP sintasa y citrato sintasa) relacionados con la biogénesis, la función mitocondrial, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa (155,158–161). Además, una menor biogénesis mitocondrial con disminución en la expresión de PGC1 $\alpha$  disminuye también

la expresión de genes mitocondriales relacionados con la fosforilación oxidativa, como la COX (150), por lo que existe una relación entre ambos procesos. Esta relación es mediada en parte por la coactivación que ejerce PGC1 $\alpha$  sobre los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) que, además de relacionarse con el metabolismo mitocondrial, regulan la síntesis de anti-oxidantes, de forma que una actividad reducida de PGC1 $\alpha$  puede aumentar aún más el estrés oxidativo. De hecho, la mejora de la función mitocondrial a través de la activación de PGC1 $\alpha$  ha mostrado un efecto beneficioso sobre el envejecimiento (162).

Desde el punto de vista metabólico, parece existir en los AAA un aumento de las vías anaeróbicas y una disminución de la glicolisis de la pared aórtica normal (129,159). Estos datos apoyan la existencia de una alteración de la función mitocondrial y del metabolismo energético en los AAA lo que llevaría al aumento en la formación de ROS (129,155,159).

Además, estudios recientes evidencian una posible relación entre el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial y los procesos de envejecimiento y de desarrollo de AAA. La homeostasis mitocondrial (incluyendo los mecanismos de dinámica mitocondrial y los de control de calidad mitocondrial) resulta esencial para adaptarse a las necesidades energéticas, mantener una masa mitocondrial funcionante y eliminar las mitocondrias dañadas (157). Cooper HA et al. han observado una posible relación entre los procesos de fusión y fisión mitocondrial y el desarrollo de AAA (163). En cuanto a la mitofagia, se ha observado que ésta disminuye con la edad (164,165). La acumulación de mitocondrias dañadas podría favorecer una excesiva activación de las señales inflamatorias, lo que aumenta la producción de ROS y causaría un círculo vicioso de mayor daño en el ADNmt con mayor aumento de ROS hasta

producirse la muerte celular. Además, la inflamación y el exceso de ROS activan la caspasa 1, que a su vez activa aún más el infiltrado inflamatorio e inhibe la mitofagia (157).



*"El que no sabe lo que busca, no ve lo que encuentra"*

*Claude Bernard*

# JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS



## **V. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.**

Resulta de suma importancia conocer en profundidad el proceso molecular que desencadena la degeneración aneurismática para desarrollar medidas preventivas y tratamientos que eviten o frenen el avance de esta enfermedad que solo cuenta con opciones quirúrgicas para evitar su fatal rotura. Se encuentra ampliamente aceptado que en el AAA se produce una degradación de la MEC y una apoptosis de CML de la capa media, así como un exceso de inflamación y estrés oxidativo. Sin embargo, aunque escasas, existen referencias del papel de la mitocondria en el desarrollo del AAA, habiéndose relacionado con alteraciones en el metabolismo, la función y la homeostasis mitocondrial, así como con un exceso de ROS mitocondriales. Nuestro estudio busca aportar nuevos conocimientos sobre la patogenia del AAA centrándose en esta organela.

Con respecto al FXa, que encontramos en grandes cantidades en el TIL que presentan la mayoría de los AAA, diversos estudios han documentado efectos proteolíticos y pro-inflamatorios sobre la pared vascular. Asimismo, se ha observado que puede modificar la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y el metabolismo energético, lo que podría estar mediado, al menos en parte, por alteraciones del metabolismo mitocondrial. De este modo, su activación podría jugar un papel patogénico en el desarrollo del AAA, siendo una posible diana terapéutica.

Por todo lo anterior, la hipótesis del presente trabajo de investigación doctoral es la existencia de cambios en la función y homeostasis mitocondrial que podrían explicar parte de la patogenia del AAA. Estas modificaciones pueden estar mediadas por el FXa. De ser así, la inhibición selectiva de este FXa con rivaroxabán podría revertirlas y ser un posible tratamiento médico que actúe sobre los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad.



*“El buen médico trata las enfermedades,  
pero el gran médico trata al paciente”*

*William Osler*

## OBJETIVOS



## **VI. OBJETIVOS.**

### **1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el papel de la función y homeostasis mitocondrial en la patogénesis del AAA y analizar si la inhibición del FXa endógeno con rivaroxabán puede modular estas posibles alteraciones.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo principal, el trabajo se ha dividido en objetivos específicos.

### **1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Analizar si existen diferencias en la actividad enzimática de proteínas relacionadas con la función mitocondrial en el AAA y en muestras de aortas sanas tomadas como grupo control.
2. Analizar la dinámica mitocondrial, en concreto la activación de la fisión, a través de la proteína Drp1 en el AAA y valorar las diferencias con respecto a la pared aórtica sana.
3. Estudiar la activación de la mitofagia por la vía de PINK1-Parkin presente en la pared de los AAA y evaluar si existen variaciones con respecto a la pared aórtica sana.
4. Determinar *in vitro* si la inhibición selectiva del FXa con rivaroxabán podría alterar la expresión de proteínas relacionadas con la funcionalidad mitocondrial en muestras de AAA.

5. Determinar *in vitro* si la inhibición selectiva del FXa con rivaroxabán podría tener efecto sobre la fisión mitocondrial en el AAA y ser causa de la modificación de la expresión de proteínas relacionadas con este proceso.
  
6. Determinar *in vitro* si la inhibición selectiva del FXa con rivaroxabán podría tener efecto sobre la mitofagia en el AAA y ser causa de la modificación de la expresión de proteínas relacionadas con este proceso.

*"Las ciencias tienen las raíces amargas  
pero muy dulces frutos"*

*Aristóteles*

# MATERIAL Y MÉTODOS



## **VII. MATERIAL Y METODOS.**

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio *in vitro* para observar las diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con la función mitocondrial, dinámica mitocondrial y mitofagia en muestras de AAA humanos respecto a aortas sanas. Además, se analizaron dichas determinaciones moleculares en segmentos de AAA incubados con rivaroxabán para estudiar el posible efecto protector de este fármaco sobre la pared aórtica enferma.

### **1. SELECCIÓN DE PACIENTES.**

#### **1.1. Pacientes con aneurisma de aorta abdominal.**

Las muestras aneurismáticas fueron obtenidas de seis pacientes sometidos a cirugía electiva para reparación de su AAA en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (España). Todos los pacientes contaban con un angioTC en el que se demostraba la presencia de un AAA infrarrenal en rango quirúrgico (> 50 mm) con TIL y con ausencia de dilataciones a nivel de aorta torácica.

Fueron excluidos aquellos pacientes con síndrome de Marfan, enfermedades inflamatorias sistémicas, oncológicas o infecciosas y los que se hubiesen sometido a algún procedimiento quirúrgico en los seis meses previos. En todos los pacientes se retiró cualquier tipo de medicación antiagregante o anticoagulante al menos doce días antes de la intervención quirúrgica.

#### **1.2. Grupo control.**

Las muestras control se recogieron durante la extracción de órganos de seis donantes fallecidos por traumatismo craneoencefálico en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid

(España). Se realizó la medición del diámetro aórtico con una pinza quirúrgica centimetrada comprobando que se encontraba por debajo de los 2 cm en toda su longitud.

## **2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA.**

En los pacientes con AAA, las muestras de pared aórtica se recogieron durante su cirugía electiva, siendo seccionada la porción de aorta infrarrenal más dilatada. En el caso del grupo control, las muestras se obtuvieron durante la extracción de órganos, seleccionándose un segmento de pared aórtica inmediatamente infrarrenal. Ninguna de las muestras de donantes presentaba TIL asociado.

Todas las muestras aórticas obtenidas fueron lavadas con suero salino isotónico de forma cuidadosa retirando los restos de grasa, sangre y trombo. Posteriormente fueron seccionadas con bisturí en porciones de unos 5 mm aproximadamente cada una e incubadas en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI).

## **3. INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.**

### **3.1. Protocolo de incubación y diseño experimental.**

Se empleó el medio RPMI 1640 *Gibco®* (*Invitrogen Corporation, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*) sin rojo fenol (nº de catálogo 11835-063), para evitar interacciones en el análisis colorimétrico posterior, y suplementado tal y como se indica en la tabla 3.

**Tabla 3. Composición del medio RPMI de cultivo utilizado.** Fuente: producción propia.

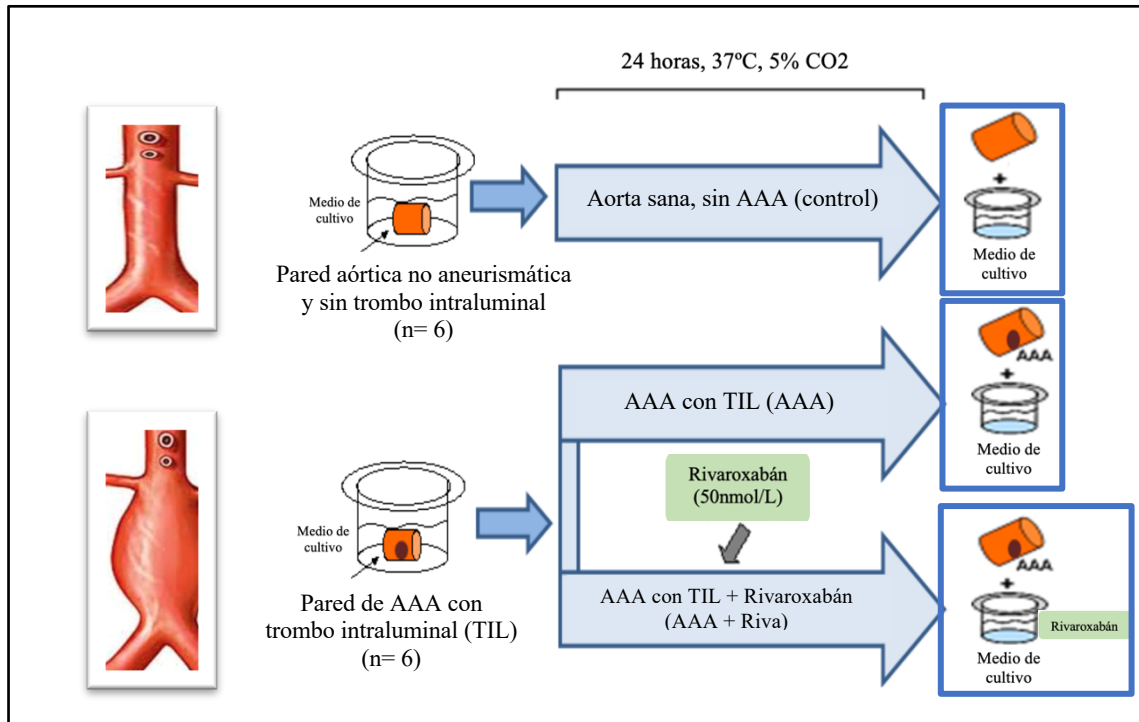
Composición medio RPMI 1640 Gibco® suplementado	
• Suero fetal bovino.....	1%
• Glutamina.....	5 mmol/L
• L-arginina .....	0,01 mmol/L
• Estreptomicina .....	$2 \times 10^{-5}$ U/L
• Penicilina .....	$2 \times 10^{-5}$ U/L

Los segmentos aórticos se incubaron en medio RPMI a 37°C en una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono durante 24 horas. Cada fragmento de pared aórtica aneurismática se incubó en ausencia y presencia de 50 nmol/L de rivaroxabán (Bay 59-7939) diluido en dimetil sulfóxido (1%). La misma concentración de dimetil sulfóxido fue añadida a las muestras de pared aórtica control y de pared aórtica aneurismática sin rivaroxabán.

Las concentraciones de rivaroxabán fueron calculadas según investigaciones previas de nuestro grupo de trabajo basadas en una curva de concentración – respuesta donde se demostró que se precisan 50 nmol/L del fármaco para inhibir toda la trombina contenida en el AAA (122), este resultado también fue reportado por otros autores (166). Además, la concentración de 50 nmol/L es equivalente a 200 µg/L, que es la que alcanzan los pacientes tratados con una dosis estándar de 20 mg diarios de rivaroxabán.

En la figura 20 se muestra un esquema del diseño experimental.

**Figura 20. Resumen esquemático del diseño experimental.** Existen 3 grupos: 1. control, 2. AAA y 3. AAA + Rivaroxabán. AAA: aneurisma de aorta abdominal. CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono.  
Fuente: producción propia.



Una vez finalizado el periodo de incubación, los explantes de pared aórtica sana (grupo control), de AAA sin rivaroxabán (grupo AAA) y de AAA con rivaroxabán (AAA + Riva) fueron congelados de forma inmediata a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar las distintas determinaciones moleculares, a excepción de las muestras utilizadas para la medición de la actividad enzimática que se procesaron de inmediato para no perder potencia.

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones de esterilidad. Es importante remarcar que las muestras aórticas del grupo control se deben considerar solo como una aproximación de los valores normales.

#### **4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS DETERMINACIONES MOLECULARES REALIZADAS.**

##### **4.1. Medición del contenido en ADN.**

El ADN se extrajo de todas las muestras utilizando el kit comercial PrepFiler™ (*Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU*) basado en la unión específica del ADN a partículas magnéticas. Su contenido fue medido mediante el kit de ensayo de alta sensibilidad de ADN bicatenario Qubit™ (*Invitrogen, Paisley, Reino Unido*) que realiza una cuantificación por métodos fluorométricos. Se expresó como concentración de ADN por miligramo de tejido aórtico. Esta medida indica la cantidad o densidad celular de los segmentos aórticos normales y de los aneurismáticos en presencia y ausencia de rivaroxabán.

##### **4.2. Determinaciones de actividad enzimática de la citrato sintasa y la citocromo C oxidasa.**

###### 4.2.1. Material empleado.

- Tampón Tris con detergente Triton X-100, NaCl, PMSF, EDTA y cóctel inhibidor de proteasas (Sigma™).
- Kit de ácido bicinconínico (BCA) kit Pierce® BCA Protein Assay (*Rockford, IL, EEUU*).
- BSA: albúmina de suero bovino.
- Kit comercial para determinar la actividad enzimática de la citrato sintasa (*K 318 - 1000 Biovision, Milpitas, CA, EEUU; ab39401, Abcam, Cambridge, Reino Unido*)
- Kit comercial para determinar la actividad enzimática de la citocromo C oxidasa (*109911, Abcam, Cambridge, Reino Unido*).
- Espectrofotómetro BioAquarius (CECIL®).

#### 4.2.2. Preparación de las muestras.

La homogeneización de tejidos y células en laboratorio se realiza con el objetivo de conseguir la fragmentación celular para obtener su contenido.

Las muestras de pared aórtica se homogeneizaron mediante incubación con una solución de lisis celular, el tampón tris-hidroximetil-aminometano (Tris), manteniendo el pH en 7.5, con un agente detergente no iónico (Triton X-100) e inhibidores de proteasas como el fluoruro de fenil metil sulfonil (PMSF), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) que, además de quelante de iones bivalentes, es inhibidor de MPP y nucleasas. Las concentraciones de los reactantes se detallan a continuación:

- Triton X-100.....1%.
- NaCl.....150 mmol/L.
- Tris ..... 20 mmol/L.
- PMSF ..... 0.5 mmol/L.
- EDTA .....0.5 mmol/L.
- Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma™)..... 0.5%.

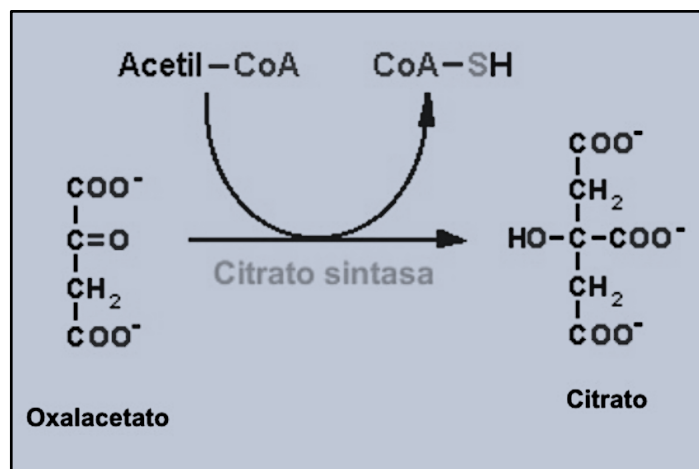
Con el *kit Pierce® BCA Protein Assay (Rockford, IL, EEUU)* se realizó la detección y cuantificación colorimétrica de proteínas totales de cada muestra. El método se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  que genera un color púrpura proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Para correlacionar la intensidad del color púrpura y la concentración de proteína se utiliza una curva patrón de concentraciones conocidas de la proteína albúmina de suero bovino (BSA).

#### 4.2.3. Análisis.

La citrato sintasa es una enzima que se encuentra en la matriz mitocondrial y que cataliza el primer paso del ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico realizando la conversión de acetil-CoA y oxalacetato en citrato (figura 21).

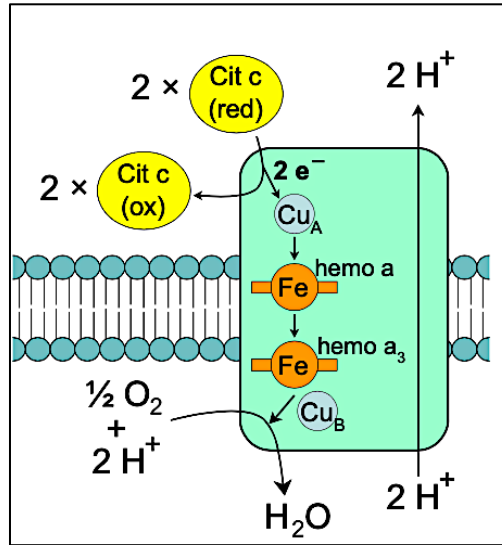
**Figura 21. Reacción catalizada por la enzima citrato sintasa.**

Fuente: <https://es.slideshare.net/vcmiguel/ciclo-krebs2010>



La COX o complejo IV es una proteína transmembrana esencial en la producción de energía celular. Se encuentra situada en la membrana mitocondrial interna y es una enzima que forma parte de la cadena de transporte de electrones. La COX transfiere los electrones al oxígeno que se reduce formando agua. Por cada 2 electrones que se transfieren al oxígeno, se translocan 2 protones de la matriz al espacio intermembrana generando el gradiente electroquímico transmembrana que permite a la enzima ATP sintasa formar las moléculas de ATP (figura 22).

**Figura 22. Reacción catalizada por la enzima citocromo C oxidasa o complejo IV de la cadena transportadora de electrones.** Fuente: [http://biomodel.uah.es/metab/mitoc/mitoE\\_cIV.htm](http://biomodel.uah.es/metab/mitoc/mitoE_cIV.htm)



La actividad de ambas enzimas se determinó mediante kits colorimétricos comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad de la citrato sintasa se cuantificó colorimétricamente mediante la conversión de acetil-CoA y oxalacetato en citrato (*K 318 - 1000 Biovision, Milpita, CA, EEUU; ab39401, Abcam, Cambridge, Reino Unido*). En el caso de la COX, su actividad se estima a través de los cambios colorimétricos asociados a la oxidación del citocromo C reducido (*109911, Abcam, Cambridge, Reino Unido*). Los cambios colorimétricos se determinaron en espectrofotómetro BioAquarius (CECIL®) durante un período de 50 minutos para la citrato sintasa y de 30 minutos para la COX.

La actividad de ambas enzimas se considera marcador enzimático cuantitativo de la masa mitocondrial funcional.

Además, se estudió la correlación entre la actividad de estas enzimas y el diámetro del aneurisma.

### **4.3. Aislamiento de extractos mitocondriales y citosólicos.**

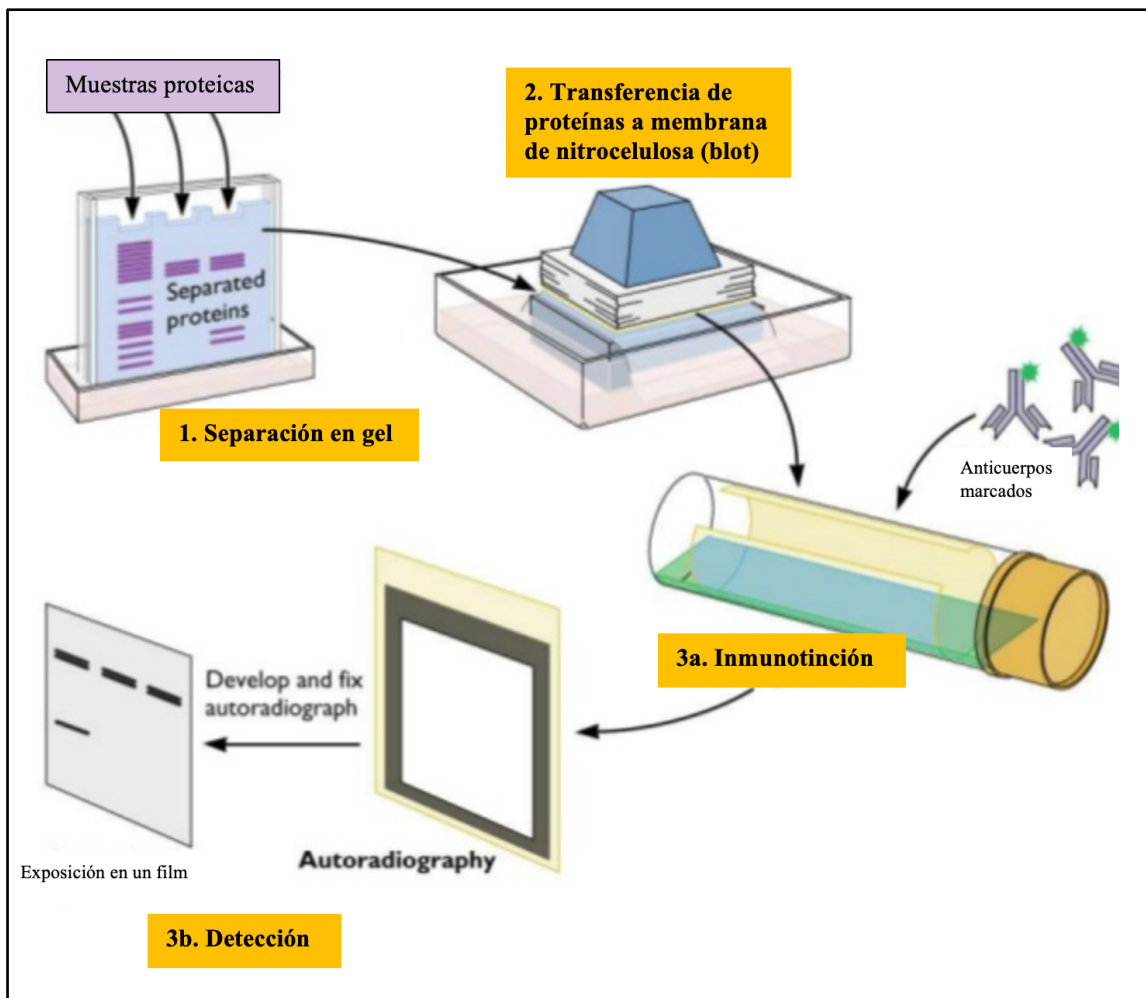
Para la extracción mitocondrial se utilizó un kit comercial (*Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells Ref.89874 THERMOFISHER*), basado en la rotura suave de las membranas citoplasmáticas celulares y aislamiento mitocondrial. A continuación, se describe de manera abreviada los principales pasos:

1. Incubar secciones de 0,5 x 0,5 cm de los anillos aórticos sometidos con 800  $\mu$ L de Reactivo A (detergente moderado) con antiproteásicos, durante 30 minutos a temperatura ambiente
2. Añadir 10  $\mu$ L de Reactivo B. Vortear a máxima potencia durante 15 segundos
3. Incubar en hielo 5 minutos, vortear a máxima potencia cada minuto.
4. Añadir 800  $\mu$ L de Reactivo C (detergente suave) con antiproteásicos e invertir en rueda giratoria durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Centrifugar a 700 G durante 10 minutos a 4°C.
6. Transferir sobrenadantes a eppendorfs de 2 ml nuevos y centrifugar a 12000 G durante 15 minutos a 4°C. (Conservar el pellet hasta comprobar que la extracción mitocondrial se ha hecho correctamente, mediante medida de proteína).
7. Transferir los sobrenadantes de esta segunda centrifugación a eppendorfs nuevos. Estos sobrenadantes serán los correspondientes a la fracción citosólica.
8. Añadir 500  $\mu$ L de Reactivo C con antiproteásicos a cada muestra de pellet y centrifugar a 12000 G durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante. El pellet que queda en los eppendorfs corresponderá a la fracción mitocondrial.

#### 4.4. Determinación de las proteínas Drp1 mediante Western Blot

El contenido de Drp1 en las mitocondrias y de Drp1 citosólico fosforilado en Ser637 se determinaron mediante la técnica de Western-blot (figura 23). El Western-blot permite determinar de forma semicuantitativa la expresión de una proteína específica de un extracto tisular mediante el reconocimiento anticuerpo - antígeno.

**Figura 23. Esquema de la técnica de Western-blot o inmunoblot.** Fuente: modificado de <https://es.slideshare.net/tratamiento1/fundamento-y-procedimiento-de-las-pruebas-de-western-blot>



La técnica de Western blot, consta de tres etapas:

1. Electroforesis en gel para separar las proteínas en función del criterio que se desee: su punto isoeléctrico, su peso molecular, su carga eléctrica, etc. La más frecuentemente usada es la SDS-PAGE que desnaturaliza las proteínas haciendo que pierdan la estructura secundaria y terciaria y las separa por tamaño.
2. Transferencia (blotting) a un soporte sólido, normalmente a una membrana de nitrocelulosa o de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por difusión, por vacío o por acción de un campo magnético (electrotransferencia). Este paso se realiza porque los geles no son un buen sustrato para la inmunodetección debido a su fragilidad.
3. Inmunodetección: detección de la proteína de interés. Para ello se emplea un anticuerpo específico para dicha proteína denominado anticuerpo primario. Tras lavar la membrana para eliminar el anticuerpo no unido, se emplea un anticuerpo secundario, que reconoce una región concreta del anticuerpo primario con el fin de amplificar la señal. Este anticuerpo secundario puede llevar unido una enzima que catalice una reacción colorimétrica o quimioluminiscente o bien encontrarse marcado con fluorescencia, para cuantificar la expresión relativa de esa proteína.

#### 4.4.1. Material empleado.

- *Kit Pierce® BCA Protein Assay.*
- Papel de filtro.
- Tampón *Laemmli*.
- Gel de poliacrilamida *SDS-PAGE* al 15%.
- Tinción *Coomassi Brilliant Blue*.
- PBS (*Phosphate-buffered saline*) para lavado.

- Membrana de nitrocelulosa (*Immobilion-P*®).
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- Marcadores de peso molecular (*Sigma*®-*Aldrich*, *St Louis, MI, EEUU*).
- Tampón de bloqueo TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*).
- Anticuerpos primarios
  - Anticuerpo monoclonal contra Drp1 (*1: 1.000 ab56788; Abcam, Cambridge, Reino Unido*).
  - Anticuerpo policlonal contra Drp1 fosforilado en Ser637 (*1: 1.000 ab193216; Abcam, Cambridge, Reino Unido*).
  - Anticuerpo anti-  $\beta$ - actina (*A-5441, Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EE. UU*)
- Anticuerpos secundarios
  - IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; USA*) para Drp1 fosforilado en Ser637.
  - IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA*) para Drp1 y para la  $\beta$ -actina.
- Kit ECL plus (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; EEUU*).
- Sistema de imagen iBright (*Ibriht FL100, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU*).
- Densitómetro.

#### 4.4.2. Preparación de las muestras.

Una vez aislados y homogeneizados los extractos citosólicos y mitocondriales fueron homogeneizados mediante Ultra-Turrax-T8® (*IKA-Werke; GmbH & Co, Staufen, Alemania*), posteriormente fueron centrifugadas durante 10 minutos a 12000 rpm a 4° centígrados. Se

cuantificaron 40 mg de proteína total citosólica y mitocondrial de cada muestra de pared aórtica mediante el kit Pierce® BCA Protein Assay para que su análisis fuese comparable mediante la técnica Western-blot.

Posteriormente, a esos 40 mg de proteínas se le añadió un volumen equivalente de tampón *Laemmli* con un pH de 6.8 (tabla 4) que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol y dodecilsulfato sódico (SDS) para reducir y desnaturalizar las proteínas.

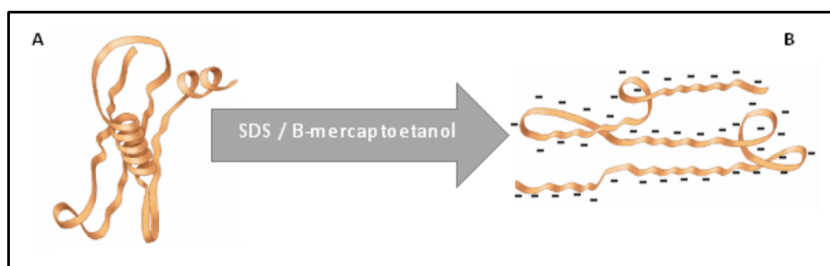
**Tabla 4. Composición del tampón Laemmli.** Fuente: producción propia.

Tampón Laemmli	
• Glicerol.....	20%
• $\beta$ -mercaptoetanol .....	10%
• SDS (Dodecilsulfato sódico) .....	4%
• Azul de bromofenol .....	0,004%
• M Tris-HCl .....	125 mM

El  $\beta$ -mercaptoetanol es un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y el SDS dota a todas las proteínas de la misma carga negativa y también contribuye a la pérdida de su estructura secundaria y terciaria, es decir, a desnaturalizarlas (figura 24).

**Figura 24. Esquema que muestra la desnaturalización de las proteínas.** A. Proteína nativa. B. Estructura de la proteína tras la incubación con  $\beta$ -mercaptoetanol y dodecilsulfato sódico (SDS), con pérdida de su estructura secundaria y terciaria (proteína desnaturalizada) y cargada negativamente.

Fuente: tomado de <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>.



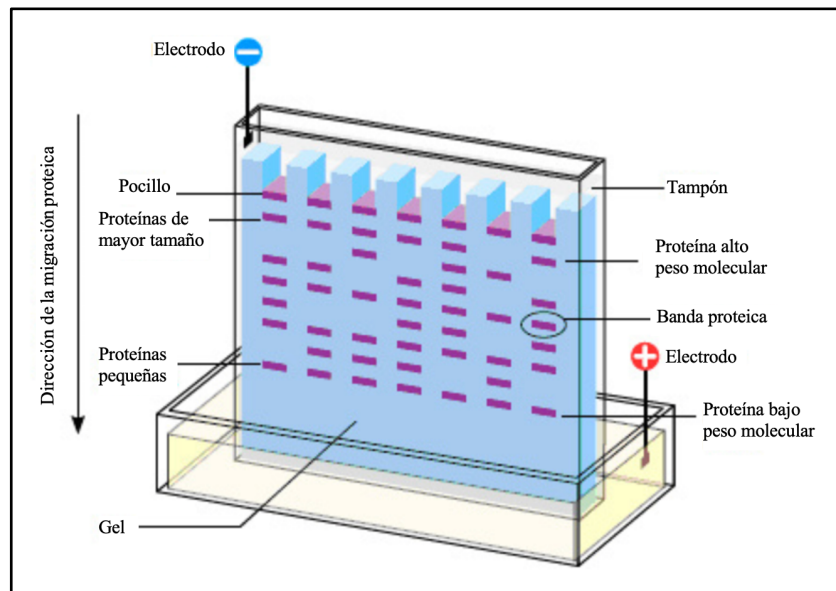
#### 4.4.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida vertical en condiciones desnaturalizantes.

La electroforesis en gel utilizada fue la SDS - PAGE consistente en un gel de poliacrilamida y un tampón con el detergente SDS. El porcentaje total de acrilamida polimerizada fue del 15%.

Como se ha descrito en el apartado anterior, las proteínas se cargan en los pocillos del gel en condiciones desnaturalizantes. Una vez cargado el gel, se somete a un campo eléctrico que provoca la migración de las proteínas al electrodo positivo con una velocidad inversa a su tamaño. De esta forma, las proteínas quedan separadas en función de su peso molecular (figura 25).

**Figura 25. Electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes.**

Fuente: modificado de <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot>



Para verificar que se cargaron cantidades iguales de proteínas mitocondriales en el gel, se corrió un gel paralelo con muestras idénticas y se tiñó con *Coomassie Brilliant Blue*. En el caso de las proteínas del citosol, se utilizó como control de carga la expresión de la proteína

constitutiva  $\beta$ -actina. Para monitorizar la progresión de la electroforesis se utilizaron los marcadores de peso molecular *Sigma- Aldrich*® (*St. Louis, MI, EEUU*), que contiene una mezcla de proteínas purificadas de peso molecular conocido.

#### 4.4.4. Transferencia (*blotting*) y bloqueo de las proteínas.

Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Immobilion-P*®) mediante la aplicación de un campo magnético perpendicular al gel (electrotransferencia). A continuación, se lavaron las membranas con el tampón PBS (*Phosphate-buffered saline*).

La membrana es una superficie adherente para todas las proteínas, por lo que los anticuerpos que se añadirán en el siguiente paso podrían unirse de forma no específica a los huecos libres generando falsos positivos. Para evitarlo, se incubó la membrana con BSA al 5% (peso / volumen) a 4° C durante toda la noche y con agitación suave para garantizar la adecuada distribución.

#### 4.4.5. Cuantificación de expresión de proteínas.

A continuación, se incubaron las membranas de nitrocelulosa a 4° C durante 12 horas, con agitación suave, con un anticuerpo monoclonal específico contra Drp1 (*ab56788; Abcam, Cambridge, Reino Unido*) y un anticuerpo policlonal contra Drp1 fosforilado en Ser637 (*ab193216; Abcam, Cambridge, Reino Unido*) ambos con una dilución de 1:1000. Asimismo, se añadió un anticuerpo contra la  $\beta$ -actina utilizada como control de carga (*A-5441, Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EE. UU*) con una dilución de 1:1500.

Posteriormente, se lavaron de forma repetida las membranas con el tampón PBS (TBS-T: *Tris-Buffered Saline Tween-20*) para retirar el exceso de anticuerpos no unido específicamente a su correspondiente antígeno y se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante 1 hora con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (figura 26).

- IgG anti-ratón (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EEUU*) en dilución 1:2500 para Drp1.
- IgG anti-conejo (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; EEUU*) en dilución 1:2500 para Drp1 fosforilado en Ser637.
- IgG anti-ratón (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, EEUU*) en dilución de 1: 7.500 para la detección de la  $\beta$ -actina.

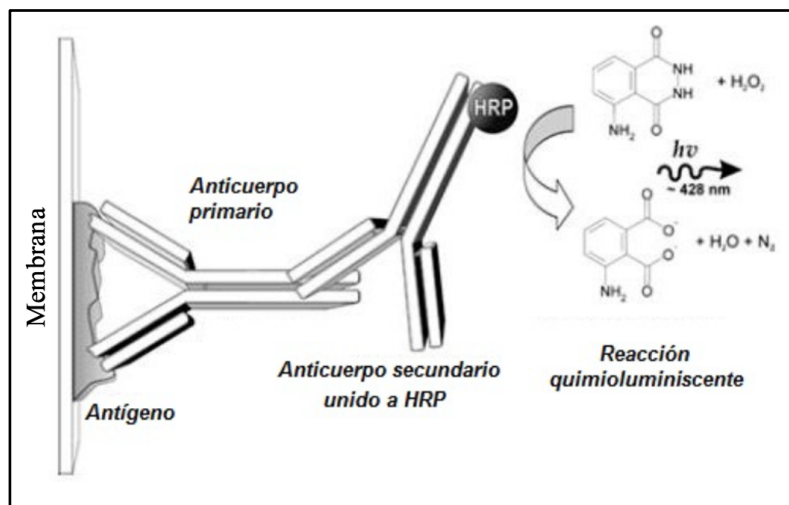
Previo al análisis de las membranas se realizaron 3 -5 nuevos lavados con TBS-T para retirar el exceso de anticuerpos secundarios.

#### 4.4.6. Análisis densitométrico de expresión proteica.

Para el análisis de las membranas, éstas se incubaron con el kit ECL® (*General Electric Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido*) cuyo sustrato se une a la HRP conjugada con los anticuerpos secundarios generando una señal luminiscente que fue detectada utilizando una cámara CCD. Esta imagen se digitaliza mediante el sistema de imagen iBright (*Ibright FL100, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU*) y se analiza la cantidad relativa de la mancha mediante densitometría óptica cuantificándose la expresión de las proteínas a estudio mediante unidades arbitrarias (UA) densitométricas.

**Figura 26. Esquema de la inmunodetección por métodos quimioluminiscentes.**

Fuente: tomado de [https://www.wikiwand.com/es/Western\\_blot](https://www.wikiwand.com/es/Western_blot)



#### 4.5. Determinación de la interacción PINK1-Parkin mitocondrial por dot-blot.

La expresión de Parkin se midió por Western-Blot, pero debido al nivel relativamente bajo de interacción PINK1-Parkin mitocondrial se optó en este caso por un análisis Dot-blot para no perder sensibilidad con la técnica de Western-blot.

El Dot-blot es una técnica de biología molecular similar a Western-blot pero con un método simplificado. En este caso, las proteínas no son separadas por electroforesis, sino que la muestra se aplica directamente sobre la membrana. Posteriormente, al igual que en el Western-blot, se realizará la detección por anticuerpos primarios y secundarios.

##### 4.5.1. Material empleado.

- *Kit Pierce® BCA Protein Assay.*
- *Tampón Laemmli.*
- *PBS para lavado.*
- *Membrana de nitrocelulosa (Immobilion-P®).*

- BSA.
- Proteína A.
- Anticuerpos primarios
  - Anticuerpos policlonales anti-PINK1 (*ab23707, Abcam, Cambridge, Reino Unido*)
  - Anticuerpos policlonales anti-Parkin (*ab15954, Abcam, Cambridge, Reino Unido*).
- Anticuerpos secundarios
  - IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; EEUU*).
- Kit ECL plus (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; EEUU*).
- Sistema de imagen iBright (*Ibriht FL100, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU*).
- Densitómetro.

#### 4.5.2. Preparación de las muestras.

Las mitocondrias aisladas de las muestras control, las muestras de AAA y de AAA + Riva fueron lisadas con la unidad de dispersión Ultra - Turrax - T8<sup>®</sup> (*IKA-Werke; GmbH & Co, Staufen, Alemania*) y centrifugadas a 12 000 g durante 10 minutos.

Se recogieron 7,5 µg del total de proteínas del sobrenadante para que su análisis fuese comparable mediante la técnica Dot-blot.

#### 4.5.3. Técnica de determinación.

Las proteínas recogidas se incubaron con anticuerpos policlonales anti-PINK1

(ab23707, Abcam, Cambridge, Reino Unido) en una dilución de 1:25 durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, se añadió a cada muestra la proteína A en una concentración de 10 µg/mL continuando la incubación durante otras 2 horas. La proteína A es un anticuerpo secundario inespecífico que contiene agarosa cuyo peso hace que tras el centrifugado de la muestra, los antígenos PINK1 unidos a su anticuerpo primario y a su vez a la proteína A, queden en el fondo reuniéndose para los pasos posteriores.

Tras 3-5 lavados con PBS, se añadió el tampón *Laemmli* (tabla 4) y las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion-P®*) para realizar el dot-blot análisis.

A continuación, éstas se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-Parkin (ab15954, Abcam, Cambridge, Reino Unido) en una dilución de 1:1000 y se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con BSA al 5% (peso / volumen) para ocupar los sitios vacíos y reducir el ruido de fondo y los falsos positivos. Posteriormente, se realizaron 3 -5 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con HRP (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; EEUU*). Previo al análisis de las membranas se realizó un nuevo lavado a fondo de estas 3-5 veces con PBS para retirar el exceso de anticuerpos secundarios.

#### 4.5.4. Análisis

De forma similar al Western-blot, las membranas se incubaron con los reactivos quimioluminiscentes del kit ECL (*General Electric Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido*) y se detectaron usando el sistema de imagen iBright (*Ibright*

*FL100, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU*). La cuantificación relativa de la expresión relativa de la proteína Parkin y de la interacción PINK1-Parkin se llevó a cabo mediante densitometría óptica.

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los valores en cuanto a características demográficas de la muestra, actividad enzimática y expresión proteica se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media de las variables cuantitativas continuas, mientras que las cualitativas se expresaron como frecuencia.

La expresión de proteínas en el grupo AAA se comparó con el grupo control mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (control vs AAA). El test no paramétrico de Wilcoxon fue utilizado para la comparación de las muestras de AAA incubadas en ausencia y presencia de rivaroxabán (AAA vs AAA + Riva). El análisis de correlación entre las actividades citrato sintasa y la citocromo C oxidasa y el diámetro aneurismático se realizó mediante la prueba Rho-Spearman.

Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 22.0 (SPSS, Chicago, IL, EEUU). Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $P < 0.05$ .

## **6. ASPECTOS ÉTICOS.**

Las muestras utilizadas forman parte de una colección de muestras que han dado soporte a diferentes proyectos de investigación. No obstante, el proyecto es original y el estudio se ha realizado siguiendo los principios recogidos en la Declaración de Helsinki siendo aprobado por el comité ético del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (código C.I. 14/509-E).

Todos los pacientes incluidos en el estudio aceptaron voluntariamente su participación y firmaron el consentimiento informado. En el caso de los donantes de órganos las muestras aórticas fueron obtenidas previa autorización expresa de los familiares.



# VIII

---

*“Ninguna cantidad de experimentación puede probar definitivamente que tengo razón; pero sólo un experimento puede probar que estoy equivocado”*

*Albert Einstein*

## RESULTADOS



## VIII. RESULTADOS.

### 1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LA MUESTRA.

Se incluyeron muestras aórticas de 6 pacientes con AAA en rango quirúrgico y de 6 donantes de órganos fallecidos por traumatismo craneoencefálico como controles. Las características epidemiológicas, de comorbilidad y de tratamientos adyuvantes de los pacientes y controles incluidos se exponen en la tabla 5.

**Tabla 5. Características epidemiológicas y clínicas de los pacientes (AAA) y donantes (control) incluidos.**

La edad y el diámetro aneurismático se representan como media  $\pm$  error estándar de la media. IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II.

Parámetros	Control (n = 6)	AAA (n = 6)	Valor P
Edad (años)	43.50 $\pm$ 2.43	68.00 $\pm$ 3.07	0.004
Hombre / Mujer	6 / 0	6 / 0	—
Diámetro de aorta (mm)	16.83 $\pm$ 0.48	60.67 $\pm$ 9.16	0.004
Trombo intraluminal	0 / 6	6 / 6	—
Factores de riesgo			
<i>Historia de tabaquismo</i>	—	1 / 6	—
<i>Hipertensión</i>	—	5 / 6	—
<i>Dislipemia</i>	—	6 / 6	—
<i>Diabetes</i>	—	1 / 6	—
Tratamiento habitual			
Ácido acetil salicílico	—	4 / 6	—
IECAS	—	4 / 6	—
ARA-II	—	1 / 6	—
Beta-bloqueantes	—	3 / 6	—
Estatinas	—	5 / 6	—

Como era esperado, los pacientes con AAA eran mayores que el grupo control y su diámetro aórtico era aneurismático y en rango quirúrgico. Todos los pacientes con AAA incluidos en el estudio presentaban TIL en su pared aneurismática, frente a ninguno en el grupo

control; lo cual es importante remarcar por el rico contenido en FXa del TIL (122). No obstante, las muestras aórticas de ambos grupos fueron sometidas a un lavado exhaustivo para retirar todo resto de trombo, grasa y sangre previo a su incubación. Por lo tanto, el TIL no fue incluido en el tejido incubado en ningún caso.

Tal y como se exponía en los criterios de selección, los pacientes incluidos habían retirado cualquier tipo de tratamiento anticoagulante o antiagregante al menos 12 días antes de la intervención. Sin embargo, no fue posible conocer si alguno de los donantes incluidos se encontraba bajo algún tratamiento anticoagulante o antiagregante, ni su comorbilidad, por tratarse de un proceso completamente anónimo y confidencial. Por lo tanto, como se comentó en el apartado anterior, los resultados moleculares obtenidos de estas muestras de aorta sólo deben considerarse como una aproximación a los niveles normales.

## 2. CONTENIDO EN ADN.

El contenido de ADN en el AAA fue significativamente menor con respecto a las muestras control (tabla 6), indicando una pérdida de la densidad celular en el AAA.

**Tabla 6. Contenido en ADN en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) frente a controles.**

	Control (n = 6)	AAA (n = 6)	Valor P
<b>Contenido en ADN</b> (ADN en ng / mg de tejido aórtico)	1.25 ± 0.18	0.70 ± 0.38	< 0.05

En las muestras aneurismáticas, la incubación con rivaroxabán no modificó el contenido de ADN si se compara con las muestras de AAA incubadas sin el fármaco (tabla 7). Por lo

tanto, los resultados del análisis comparativo entre estos grupos, que se presentan a continuación, no pueden atribuirse a un mayor número de células.

**Tabla 7. Contenido en ADN en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) y de AAA + Rivaroxabán. NS: no significativo.**

	AAA (n = 6)	AAA + Riva (n = 6)	Valor P
<b>Contenido en ADN</b> (ADN en ng / mg de tejido aórtico)	0.70 ± 0.38	0.74 ± 0.33	NS

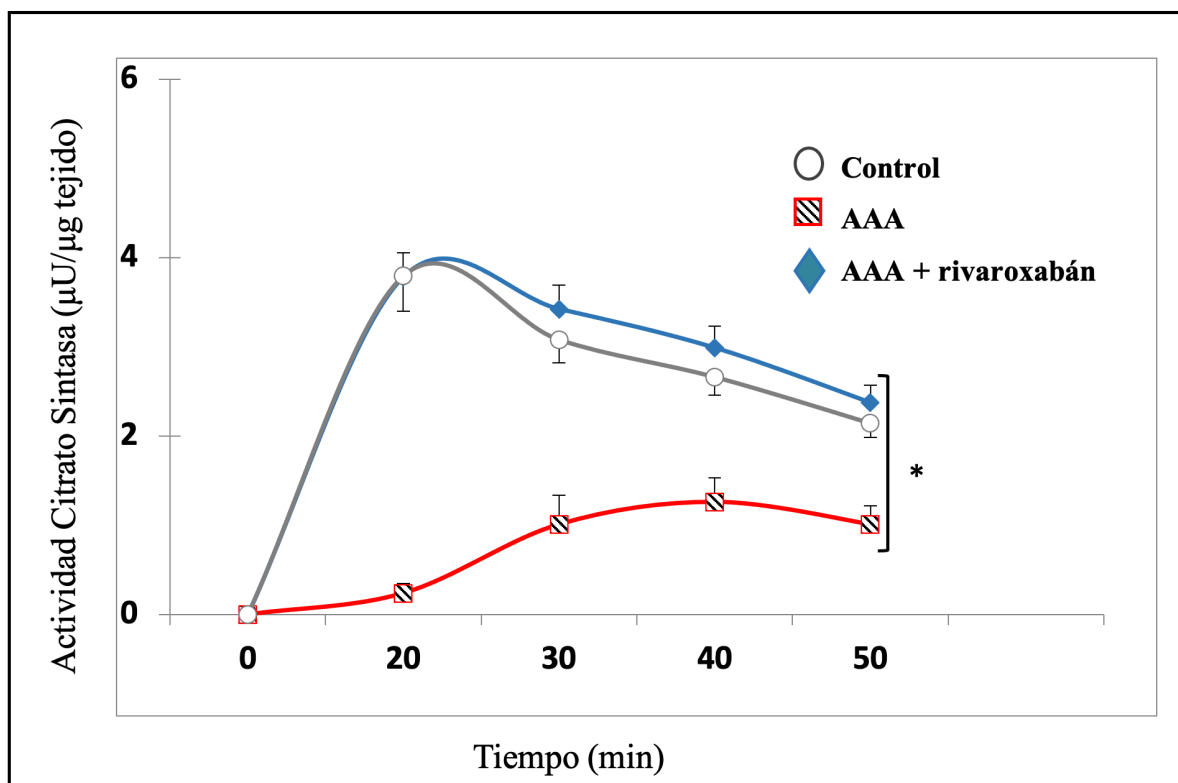
### 3. ACTIVIDAD DE LA CITRATO SINTASA Y CITOCROMO C OXIDASA.

Se analizó la actividad enzimática de las diferentes muestras (Control, AAA y AAA + rivaroxabán) tanto para la citrato sintasa como para la COX.

Se observó que la actividad de la citrato sintasa era significativamente menor en el AAA comparado con el grupo control, siendo a los 20 minutos de medición de  $0.24 \pm 0.11$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido en el grupo AAA frente a  $3.78 \pm 0.27$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido en el grupo control. A los 50 minutos, la actividad enzimática en el grupo AAA fue de  $1.01 \pm 0.21$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido, frente a  $2.37 \pm 0.20$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido del grupo control.

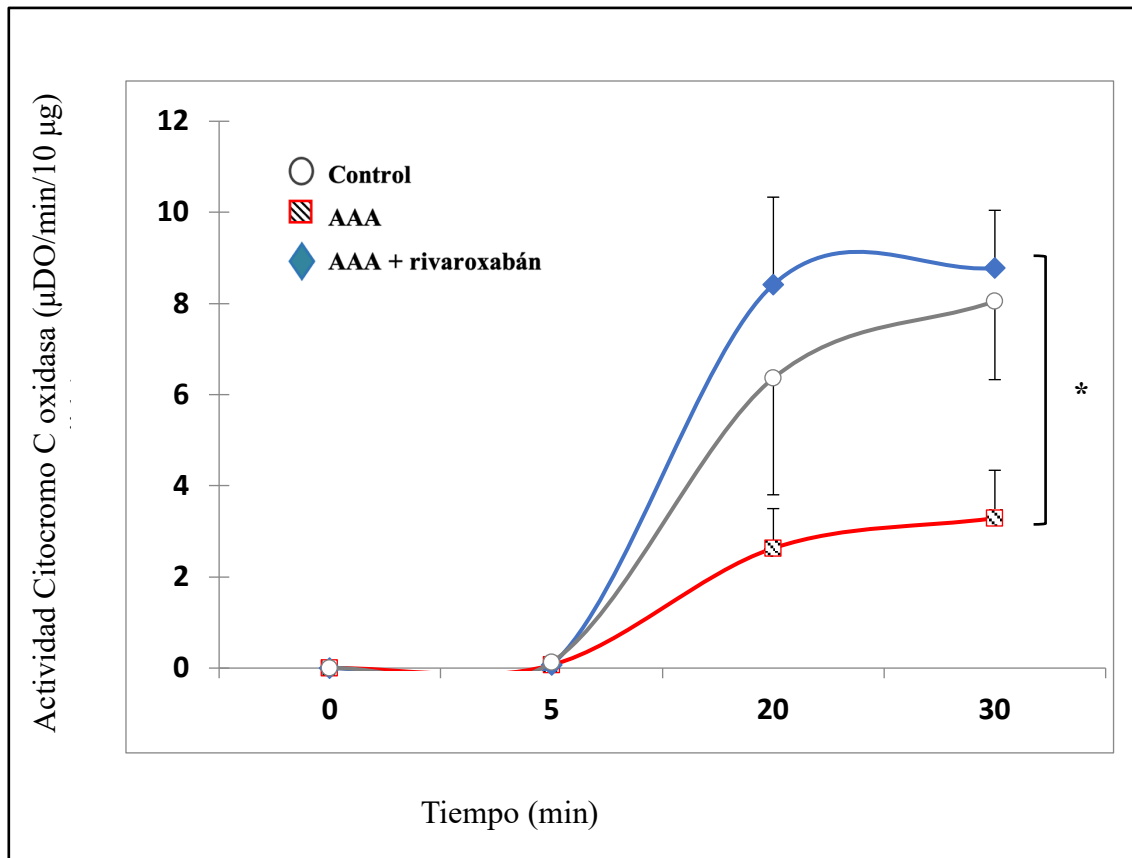
Las muestras de pared aneurismática incubadas en presencia de rivaroxabán mostraron un incremento en la actividad de esta enzima hasta niveles similares a los observados en las muestras aórticas control ( $3.80 \pm 0.10$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido a los 20 minutos y  $2.14 \pm 0.16$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido a los 50 minutos) (figura 27).

Figura 27. Actividad de la citrato sintasa en aortas sanas (control) (n = 6) y en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubadas en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán. Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar. \*Valor P < 0.05 entre curvas.



La actividad de la COX fue también significativamente menor en las muestras de AAA con respecto a las aortas control, siendo tras los 30 minutos de medición de  $3.29 \pm 1.05$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido en el grupo AAA frente a  $8.05 \pm 1.72$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido en el grupo control. Igualmente, la incubación con rivaroxabán mejoró de forma significativa su actividad enzimática registrándose niveles superiores incluso a los de actividad enzimática en el grupo control durante toda la observación ( $8.78 \pm 1.27$   $\mu\text{DO}/\text{min}/10 \mu\text{g}$  tejido a los 30 minutos) (figura 28).

**Figura 28. Actividad del citocromo C oxidasa mitocondrial en aortas sanas (n = 6) y en el aneurisma de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubadas en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán. Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar. \*Valor P < 0.05 entre curvas.**



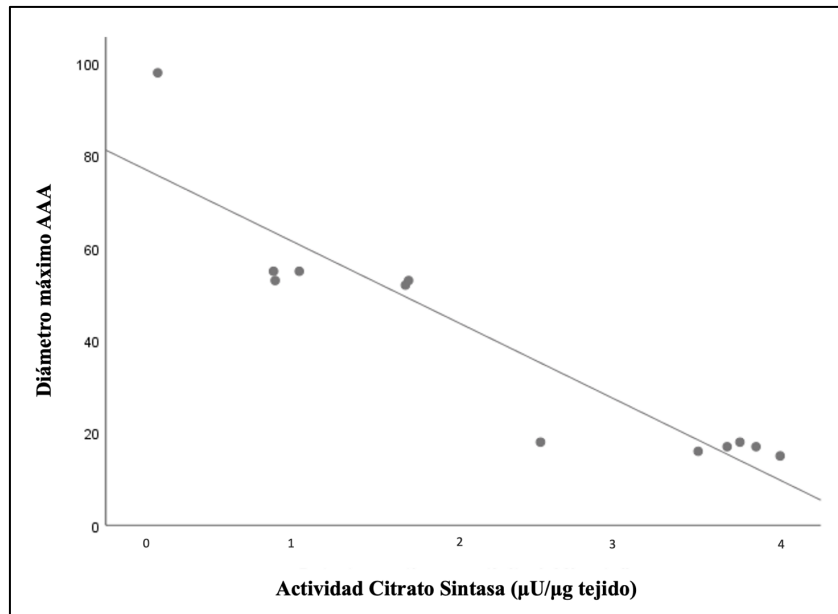
Como se puede observar en la figura 28, la actividad máxima de la COX se alcanzó a los 30 min y fue similar entre el grupo control y en las muestras aneurismáticas incubadas con rivaroxabán. Sin embargo, la diferente pendiente de ambas curvas sugiere que la actividad de la COX permaneció parcialmente disminuida en las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán a partir del minuto 20, en otras palabras, el valor máximo se alcanza en menor tiempo que en el grupo control y se estabiliza, mientras que en el grupo control el aumento es más progresivo.

En un segundo tiempo se analizó si existía relación entre la alteración de la actividad mitocondrial de estas enzimas y el diámetro del aneurisma mediante un análisis de correlación. El análisis de correlación de Spearman demuestra una asociación negativa entre el diámetro aórtico y la actividad de la citrato sintasa, de forma que cuanto mayor es el diámetro aórtico, menor funcionamiento de la citrato sintasa mitocondrial (tabla 8 y figura 29). No se encontró correlación entre la actividad de la COX y el diámetro aórtico (tabla 8).

**Tabla 8. Análisis de correlación Rho-Spearman entre el diámetro aórtico y la actividad enzimática observada de la citrato sintasa y de la citocromo C oxidasa.** Los resultados se obtuvieron tras 30 minutos de actividad enzimática. AAA: aneurisma de aorta abdominal.

Diámetro máximo del AAA.		
Actividad enzimática	Coefficiente Rho	Valor P
<b>Citrato sintasa</b>	- 0.900	< 0.001
<b>Citocromo C oxidasa</b>	- 0.456	0.136

**Figura 29. Representación gráfica entre el diámetro aórtico en el aneurisma de aorta abdominal (AAA) y la actividad enzimática de la citrato sintasa.** Los resultados se obtuvieron tras 30 minutos de actividad enzimática.

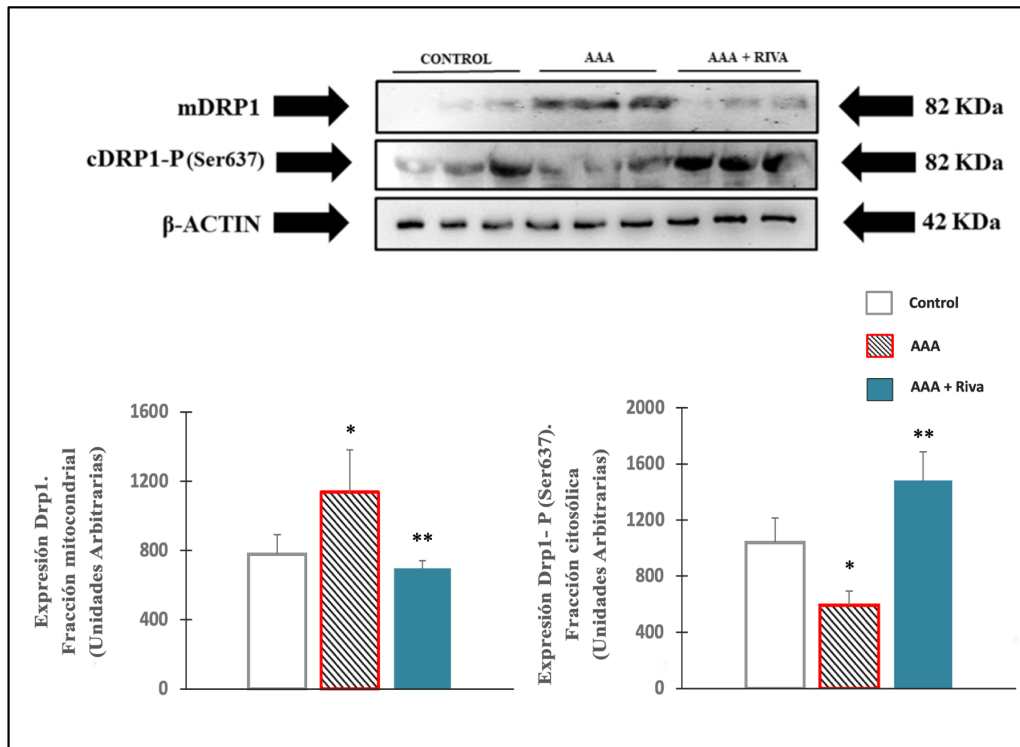


#### 4. EXPRESIÓN DE DRP1.

El análisis por Western-blot mostró una mayor expresión de Drp1 mitocondrial, marcador de fisión, en las muestras de AAA ( $1126 \pm 174$  UA) comparado con los controles sanos ( $663 \pm 85$  UA). Asimismo, la incubación de las muestras de AAA junto con rivaroxabán, resultó en una disminución significativa en la expresión de Drp1 ( $592 \pm 60$  UA) (figura 30).

Por el contrario, el contenido citosólico de Drp1 fosforilado en Ser637 fue significativamente mayor en las aortas de control ( $1041 \pm 173$  UA) que en las muestras de AAA ( $593 \pm 102$  UA). La expresión de Drp1 citosólico fosforilado con Ser637 en las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán fue incluso mayor que en las aortas de control ( $1481 \pm 207$  UA) (figura 30).

**Figura 30. Western blot representativo del contenido de Drp-1 mitocondrial (mDrp1) y Drp1 citosólico fosforilado (cDRP1-P) en Ser637 en segmentos aórticos control (n = 6) y en muestras de aneurismas de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubados en presencia y en ausencia de 50 nmol / L del inhibidor de factor FXa, rivaroxabán (Riva). La expresión de b-actina se utilizó como control de carga de la expresión de la proteína citosólica. Los gráficos de barras muestran el análisis densitométrico del Western-blot representado como unidades arbitrarias densitométricas (UA). Los valores densitométricos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media. \*Valor P < 0.05 comparando los valores de AAA con las muestras control. \*\* Valor P < 0.05 del análisis comparativo de muestras de AAA incubadas en ausencia y presencia de rivaroxabán.**



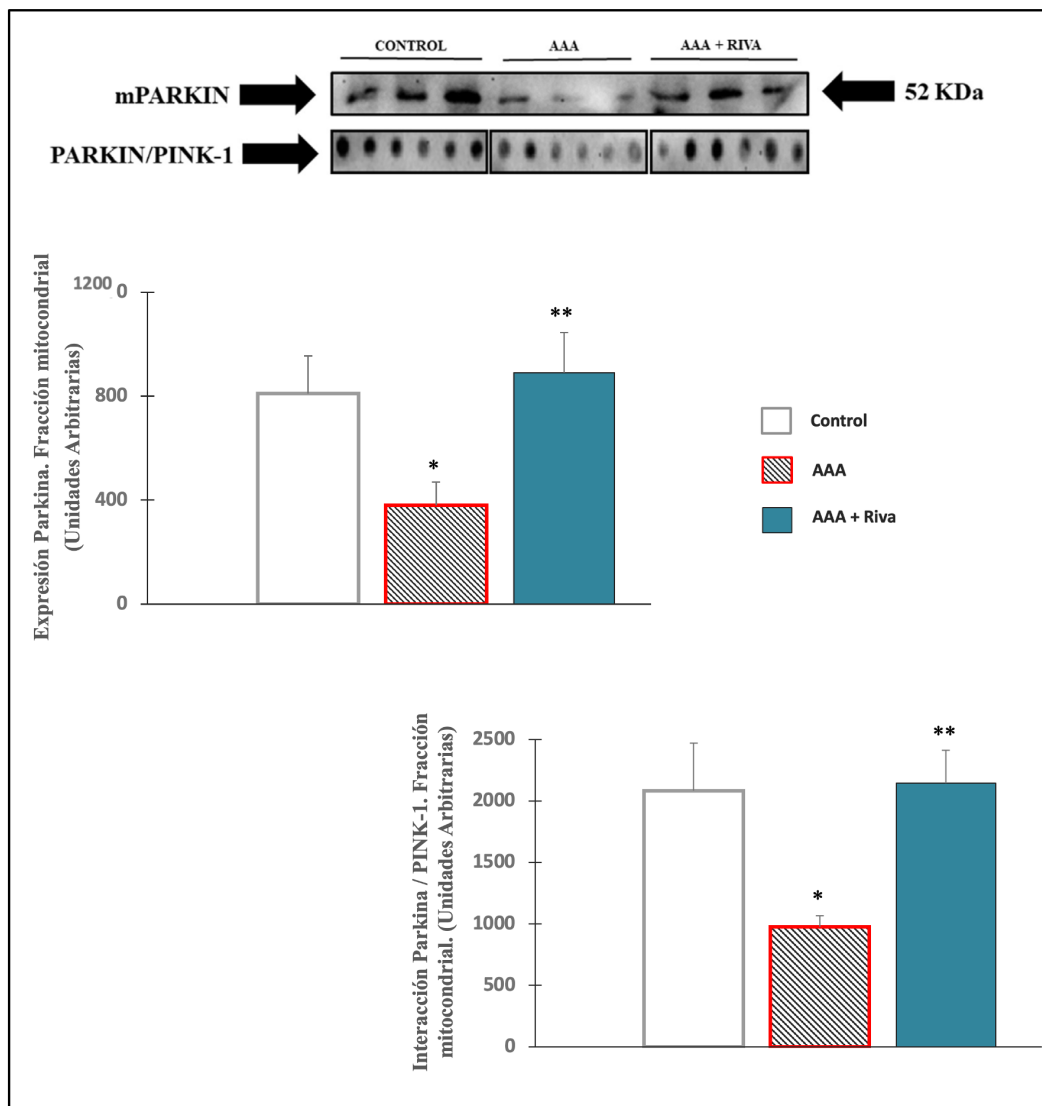
## 5. INTERACCIÓN PINK1-PARKIN.

La expresión de Parkin mitocondrial y su interacción PINK1-Parkin fue analizada por Western y Dot-blot respectivamente (figura 31).

El contenido mitocondrial de la proteína parkin se encontró significativamente disminuido en las muestras de AAA ( $355.625 \pm 74.96$  UA) con respecto al grupo control ( $805.833 \pm 115.32$  UA). La incubación de las muestras de AAA con rivaroxabán demostró un aumento significativo de expresión de la proteína parkin ( $723.75 \pm 122.46$  UA).

De forma paralela, la interacción entre PINK1 y parkin se observó reducida significativamente en el AAA ( $974 \pm 92.16$  UA) con respecto a las aortas control ( $2082.2 \pm 387.13$  UA). Asimismo, la incubación con rivaroxabán revirtió esos resultados hasta valores similares a los obtenidos en el grupo control ( $2142.83 \pm 269.56$  UA).

**Figura 31. Western-blot representativo del contenido de parkin mitocondrial y Dot-blot de la interacción parkin - PINK1 en la fracción mitocondrial de los segmentos aórticos del grupo control (n = 6) y en la pared aórtica de aneurismas de aorta abdominal (AAA) (n = 6) incubados en presencia y ausencia de 50 nmol / L del inhibidor del factor de coagulación Xa, rivaroxabán (Riva).** Los gráficos de barras muestran el análisis densitométrico del Western-blot y del Dot-blot representado como unidades arbitrarias densitométricas (UA). Los valores densitométricos se representan como media  $\pm$  error estándar de la media. \*Valor  $P < 0.05$  comparando los valores de AAA con las muestras control. \*\* Valor  $P < 0.05$  del análisis comparativo de muestras de AAA incubadas con rivaroxabán y muestras de AAA incubadas aisladamente, sin el fármaco.





*“En general hay un grado de duda, de cautela y de modestia que,  
en toda clase de investigaciones,  
debe acompañar siempre al razonador cabal”*

*David Hume*

## DISCUSIÓN



## **IX. DISCUSIÓN.**

La presente tesis doctoral pone de manifiesto la importancia de la homeostasis y funcionalidad mitocondrial en la patogenia del AAA; en concreto incorpora nuevas evidencias sobre el papel de la mitofagia en el AAA humano, no observadas anteriormente. Además, muestra por primera vez el posible papel del FXa endógeno en la expresión de proteínas relacionadas con la dinámica y la funcionalidad mitocondrial en el AAA. También, nuestro estudio sugiere que el inhibidor específico del FXa, el rivaroxabán, puede revertir estas modificaciones, siendo una posible diana terapéutica en el AAA humano.

### **1. ALTERACIONES MITOCONDRIALES EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL.**

Las mitocondrias resultan esenciales en el mantenimiento de la integridad celular, principalmente por su papel central en el metabolismo energético con generación de ATP. Pero se trata, además, de una de las fuentes principales de ROS, al generarse como producto de la cadena transportadora de electrones. La disfunción mitocondrial se ha asociado al envejecimiento celular normal de los vasos sanguíneos y a enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis y el AAA (155). La respiración mitocondrial y la integridad del ADNmt se ven reducidas con la edad y con estas enfermedades (156).

El estudio genómico comparativo entre muestras aneurismáticas y controles normales ha revelado una diferente expresión de genes relacionados con la función mitocondrial, la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa en pacientes con AAA (161). Confirmando estos hallazgos, recientes líneas de investigación sobre modelos experimentales y muestras de AAA humanos evidencian el posible papel de la disfunción mitocondrial en la

patogenia del AAA, como se expone a continuación y como hemos observado en nuestro estudio. Estas alteraciones incluyen un exceso de producción mitocondrial de ROS (167), alteraciones en la función y biogénesis mitocondrial (10,168) y un exceso de apoptosis de CML de la pared vascular mediada por las mitocondrias (169).

Con respecto a la excesiva producción de ROS, los resultados del estudio de Moñux et al. (122) evidenciaron por primera vez que en las muestras aneurismáticas existía una producción significativamente mayor de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial, demostrando una posible asociación entre el crecimiento del AAA y cambios en la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo mitocondrial. Estos datos son apoyados por estudios histológicos en los que también se ha observado una mayor expresión de la NADPH oxidasa en aortas dilatadas, siendo una de las mayores fuentes de ROS en el AAA (121). Recientemente, Navas-Madroñal et al. (170) evidenciaron también la existencia de un exceso ROS mitocondriales en la pared de AAA humanos.

Otra posible implicación de las mitocondrias en la patogenia del AAA, se observó en el estudio de Modrego J et al. (129) que demostró que en la pared del AAA humano existía una menor expresión de enzimas relacionadas con la glicólisis (en concreto de la trifosfato isomerasa, la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa y la piruvato deshidrogenasa) y un aumento del lactato. Concluyeron que en el AAA se encontraba favorecido el metabolismo anaerobio sobre el metabolismo aeróbico mitocondrial, predominante en las aortas sanas. La disminución de la respiración mitocondrial también fue objetivada en los modelos experimentales murinos que desarrollaban aneurismas de aorta torácica (159). Estas

observaciones concuerdan con el estado de hipoxia local que sufre la pared aneurismática subyacente al TIL descrito por Vorp et al. (42) y que favorecería el metabolismo anaerobio.

En cuanto a la biogénesis mitocondrial, se ha observado que la restricción calórica en ratones durante 12 semanas, conocido desencadenante de la biogénesis, promovía efectos protectores frente a la formación del AAA, existiendo una menor degradación de elastina y una disminución de apoptosis de CML. Estos cambios parecen estar mediados por un aumento de sirtuina 1 en las CML, lo que favorecería la expresión de PGC-1 $\alpha$  (implicado en la biogénesis mitocondrial) y que podría también promover la mitofagia de mitocondrias dañadas (171). Acorde con dichas observaciones halladas en modelos experimentales, en muestras aórticas de AAA humanos se ha objetivado que los niveles de expresión de PGC-1 $\alpha$ , así como de NRF1, se encontraban muy reducidos con respecto a las muestras control (170).

Por último, estudios en modelos experimentales han mostrado la existencia de apoptosis dependiente de las mitocondrias en el AAA. Es bien conocido que en el aneurisma existe un exceso de apoptosis de las CML. Esta apoptosis, que culmina en la destrucción del ADN celular, se puede iniciar por la vía extrínseca, ya demostrado en el AAA (89), de modo que macrófagos o linfocitos se unen a la célula vía Fas/Fas ligando desencadenando su muerte. Pero también se ha observado que puede iniciarse por la vía intrínseca, mediada por mitocondrias e iniciada ante daños en el ADN o estrés celular por aumento de ROS en la mitocondria. El estudio de Sinha I et al. (169), en modelos murinos con AAA inducidos por infusión de elastasa, sugirió por primera vez que la apoptosis mediada por las mitocondrias podía ser un mecanismo relevante en la patogenia del AAA. Estos autores observaron un exceso de apoptosis de CML y un aumento de caspasa 9, caspasa específica iniciadora de la

---

vía intrínseca de la apoptosis. Esta vía, mediada por las mitocondrias, puede explicar que el estrés oxidativo induzca la apoptosis de las CML de la pared aórtica. Asimismo, Yan P et al. (172) mostraron en su estudio con modelos murinos ApoE<sup>-/-</sup> que aquellos knockout para UCP-2 (UCP del inglés *mitochondrial uncoupling proteins*) presentaban una mayor incidencia de AAA e, histológicamente, una mayor fragmentación de la elastina y una pérdida de CML. Así, la deficiencia de esta proteína transmembrana mitocondrial, con efecto supresor sobre la apoptosis y efecto protector frente al daño por estrés oxidativo, incrementó la susceptibilidad y severidad de los AAA por aumento de ROS y por mayor apoptosis de las CML.

Por lo tanto, y en base a la literatura reciente, cada vez existe una mayor evidencia de que la mitocondria pueda estar alterada en el AAA, ejerciendo un papel importante en su patogenia. Estas evidencias resultan congruentes con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en los que nos centramos en la función de la mitocondria y en los mecanismos de homeostasis mitocondriales en el AAA.

### **1.1. Expresión de enzimas relacionadas con la funcionalidad mitocondrial en el aneurisma de aorta abdominal.**

La mitocondria es la principal fuente de producción energética de la célula mediante la síntesis de ATP. De esta forma, una alteración en su función principal puede poner en riesgo la supervivencia celular. Con la edad y en las enfermedades asociadas a la edad, como es el AAA, la capacidad de fosforilación oxidativa de las mitocondrias se ve disminuida (157). De hecho, se ha observado una diferente expresión de genes relacionados con la función mitocondrial y la fosforilación oxidativa en los AAA (161).

La importancia del correcto funcionamiento mitocondrial se pone en evidencia al estudiar las mutaciones acumuladas que se producen en el ADNmt, por errores replicativos o por exceso de ROS. Numerosos estudios han correlacionado estas mutaciones con el envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares, incluido el AAA (173–176). Estas mutaciones causan una alteración en el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria y en la producción energética, llevando a la disfunción mitocondrial, a una mayor producción de ROS y, en ocasiones, a la muerte celular (177).

Para valorar la función mitocondrial en el AAA, estudiamos la actividad de dos enzimas. Por un lado, la citrato sintasa, que se encuentra en la matriz mitocondrial y cataliza el paso de acetil-CoA y oxalacetato en citrato, primer paso del ciclo de Krebs. Por otro lado, la COX, proteína transmembrana que forma el complejo IV de la cadena transportadora de electrones. La actividad enzimática de ambas se encontró significativamente reducida en las muestras de AAA sugiriendo la existencia de una disfunción mitocondrial en el AAA.

Nuestros resultados son apoyados por los obtenidos por Gabrielson M et al. (158) que muestran una disminución en la expresión de marcadores relacionados con la biogénesis y la función mitocondrial, como el PGC1 $\alpha$ , la ATP sintasa y la citrato sintasa, tanto en modelos experimentales como en muestras de AAA humanos. También en sintonía con nuestras observaciones, Gao et al. (178) objetivaron que la inducción con angiotensina en ratones ApoE<sup>-/-</sup> (lo que provoca la degeneración aneurismática), reducía de forma importante la fosforilación oxidativa y la función de la cadena transportadora de electrones por daño directo en la biogénesis y en el ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, la restricción calórica (conocido inductor de la biogénesis mitocondrial) resultó protectora frente

al desarrollo de AAA al promover la respiración oxidativa y la correcta función mitocondrial. Asimismo, Navas-Madroñal et al. (170) también sugieren la implicación de la biogénesis y funcionalidad mitocondrial en la patogenia del AAA. Observaron, al igual que nosotros, una menor expresión de la citocromo C oxidasa en las muestras de AAA humanos frente al grupo control.

En nuestros experimentos, la caída en la actividad de la citrato sintasa se correlacionó con el diámetro máximo del AAA, pero esta correlación no parece existir en el caso de la COX. Ello sugiere que estas enzimas cuentan con una regulación molecular diferente de su actividad enzimática. Otros trabajos también han informado de diferentes cinéticas en las actividades de la citrato sintasa y de la COX, existiendo una mayor relación entre la citrato sintasa y la densidad mitocondrial funcionante, sugiriéndose que pueda utilizarse ésta como marcador de función mitocondrial (179,180). De esta forma, que la disfunción mitocondrial observada se haya visto correlacionada con el diámetro aneurismático puede sugerir una implicación directa de la misma en la progresión del AAA.

En el AAA existiría, por tanto, una alteración de la función mitocondrial y del metabolismo energético con aumento en la formación de ROS (129,155,159). Este estrés oxidativo puede promover la patogénesis del AAA a varios niveles. Por un lado, puede generar mutaciones en el ADNmt, lo que altera las funciones esenciales de esta organela, con menor fosforilación oxidativa, menor producción de ATP y un aumento aún mayor en la producción de ROS mitocondriales (157). Por otro lado, como se ha descrito en la introducción, puede promover la activación de MMP, la apoptosis de CML y favorecer el reclutamiento de células pro-inflamatorias. Además, las proteínas oxidadas pueden funcionar como neoantígenos

promoviendo una reacción autoinmune (39,123).

## **1.2. Expresión de Drp1, como marcador de fisión, en el aneurisma de aorta abdominal.**

Las mitocondrias son organelas dinámicas que se someten a fisión y fusión para mantener la homeostasis mitocondrial y la correcta masa mitocondrial funcionante, que se adapte a las necesidades energéticas de la célula. Con el envejecimiento, se ha demostrado que este balance entre la fisión y la fusión se ve alterado (164).

La unión de la GTPasa Drp1 a la membrana mitocondrial externa media la fisión o división mitocondrial. Sin embargo, su fosforilación en Ser637 provoca una disminución de su actividad GTPasa, manteniéndose Drp1 fosforilada en Ser637 en el citosol impidiendo la fisión mitocondrial (149,151). La activación de Drp1 se ha encontrado implicada en la disfunción endotelial existente en diabéticos y que contribuye al desarrollo de la placa aterosclerótica (181); en la activación de la respuesta inflamatoria innata (182); y en la senescencia celular inducida por el estrés oxidativo relacionada con el envejecimiento, las enfermedades vasculares y la diabetes (183).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que el contenido en Drp1 es mayor en las muestras aneurismáticas, indicando un exceso de fisión en el AAA. En consonancia, el contenido en Drp1 fosforilada en Ser637 (citósolica inactiva) en las muestras de AAA fue menor con respecto a las aortas de control.

De acuerdo con nuestras observaciones, la implicación de la dinámica mitocondrial en la patogenia del AAA ha sido recientemente sugerida por Cooper HA et al. (163). Estudiaron la

---

expresión de Drp1 en modelos experimentales de ratones ApoE<sup>-/-</sup> en los que se inducía la formación de AAA con angiotensina y la inmunohistoquímica de muestras de AAA humanos. Observaron un exceso de expresión de Drp1 en las muestras aneurismáticas humanas y en los modelos animales que desarrollaron AAA con respecto a las aortas de control. Además, examinaron el efecto del inhibidor de la fisión, el mdivi1 (Del inglés, *mitochondrial división inhibitor 1*), en los modelos experimentales y objetivaron que aquellos ratones que recibieron tratamiento con mdivi1 desarrollaban un menor diámetro aneurismático y una menor tasa de rotura, a expensas de una disminución del Drp1 mitocondrial y de una menor fisión. Analizaron el posible mecanismo molecular por el que la fisión puede participar en el desarrollo de los AAA y observaron que en los modelos tratados con mdivi1 se reducía el envejecimiento de las CML de la pared vascular, la expresión de las MMP 2 y 9 y la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1, responsable, en parte, de la respuesta inflamatoria observada en el AAA. Estos autores sugieren que la fisión mitocondrial, mediada por Drp1, promueve un fenotipo pro-inflamatorio en las CML de la pared aórtica, aumenta el estrés oxidativo y contribuye a la patogénesis del AAA.

El efecto protector de mdivi1 también ha sido reportado en la miocardiopatía hipertensiva y en los aneurismas de aorta torácica. Hasan P et al. (184) observaron una menor hipertrofia y fibrosis cardiaca en modelos experimentales tratados con mdivi1, sin encontrarse modificaciones en el control tensional, siendo esos cambios atribuibles a la inhibición de Drp1 y a una menor producción de ROS. Asimismo, en modelos animales con aneurismas de aorta torácica se ha objetivado que el aumento de la fisión aumenta el consumo de oxígeno en las CML, provocando a su vez un exceso de estrés oxidativo (185).

La fisión se encuentra también relacionada con la selección de las mitocondrias disfuncionantes que serán degradadas en el proceso de mitofagia como control de calidad mitocondrial. El hecho de que el contenido mitocondrial de Drp1 fuera mayor en el AAA que en las aortas control, junto con una disminución de PINK1-parkin, apoya la existencia de un aclaramiento mitocondrial independiente de Drp1 (149). Burman J et al. (186) obtuvieron unos resultados acordes con esta observación, concluyendo que Drp1, más que promover la mitofagia, mediante la fisión mitocondrial, evitaba que las regiones mitocondriales sanas activaran la interacción PINK1-Parkin que conduce a la mitofagia. Por lo tanto, en el AAA y según nuestros resultados, se encontraría aumentada la fisión, objetivada por el aumento de Drp1, y disminuida la mitofagia por disminución de PINK1-parkin.

### **1.3. Expresión de proteínas relacionadas con la mitofagia en el aneurisma de aorta abdominal.**

El sistema de control de calidad mitocondrial mediado por la mitofagia resulta imprescindible para mantener una población de mitocondrias funcionales suficiente, indispensable para el correcto funcionamiento celular (187). Como conocemos, su función es esencial en la formación de ATP a través de la cadena respiratoria del metabolismo aerobio pero supone una importante fuente de ROS que, en exceso, puede llevar a mutaciones del ADNmt. Con respecto al ADN nuclear, el ADNmt es más sensible al estrés oxidativo por la falta de histonas y por contar con menores mecanismos de reparación (188). Estas mutaciones pueden bloquear la formación de ciertas proteínas esenciales o llevar a la síntesis de proteínas anormales y pro-apoptóticas, conduciendo a la disfunción de la mitocondria y/o a la muerte celular. Por lo tanto, la mitofagia, proceso selectivo de eliminación de mitocondrias disfuncionales, debe funcionar correctamente para evitar una acumulación excesiva de

mitocondrias tóxicas para la integridad celular (187). De hecho, se ha observado que la mitofagia disminuye con el envejecimiento (165) y que el aumento de longevidad observado en la restricción calórica es debido, al menos en parte, a que favorece la eliminación de mitocondrias dañadas, con exceso de ROS o con mutaciones en su ADNmt (171).

La implicación de la proteína citosólica parkin en la mitofagia fue estudiada en adipocitos por Sarraf S et al. (189) y Lu X et al. (190). Estos autores estudiaron los cambios moleculares que se producen en la grasa blanca cuando, por mayor necesidad de termogénesis, se precisa su conversión a grasa parda. Esta conversión a grasa parda se produce por estímulo adrenérgico, el cual va a favorecer: un aumento de la biogénesis mitocondrial, contando con mayor capacidad oxidativa; y una disminución de la mitofagia por bloqueo de la translocación de la parkin citosólica a la mitocondria. Cuando no se precisa de mayor termogénesis, el estímulo adrenérgico desaparece y aumenta la expresión y la translocación de parkin. Esto se produce posiblemente por el daño mitocondrial que causa la alta capacidad oxidativa, con aumento de la mitofagia como mecanismo de control de calidad mitocondrial. Resultados similares se han encontrado en el estudio de neuronas del hipocampo del adulto, en los que la expresión de la proteína parkin se asocia con un aumento de la mitofagia (191).

En nuestro estudio, las muestras obtenidas de AAA contaban con un menor contenido en parkin mitocondrial comparado con el grupo control, lo que sugiere la existencia de un menor control de la calidad mitocondrial en el AAA a expensas de una disminución de la mitofagia, lo que puede llevar al exceso de ROS, a mutaciones en el ADNmt y a la pérdida de CML. Varios estudios han evidenciado en otras enfermedades la asociación entre la expresión de parkin, la disfunción mitocondrial y, en último término, la muerte celular. La forma

autosómica recesiva de la enfermedad de Parkinson juvenil, debida a mutaciones inactivantes en el gen de la proteína parkin, genera una disfunción mitocondrial que lleva a la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Asimismo, mutaciones que bloquean el gen de parkin en modelos animales de *Drosófila* evidencian el papel de esta proteína en la muerte celular, observándose que se altera el correcto funcionamiento mitocondrial y que ello lleva a una pérdida de celularidad muscular y de la línea germinal (192).

Sin embargo, en algunos casos se ha observado que la proteína parkin también podría tener un papel anti-apoptótico, dependiendo de los estímulos a los que estuviese sometida la célula (191). Es, por tanto, la translocación selectiva de la proteína parkin citosólica a las mitocondrias, mediante una interacción física con PINK1 expuesta en la membrana de mitocondrias disfuncionantes, la que inicia el proceso de mitofagia. Por lo tanto, para confirmar que la disminución de parkin que observamos se asociaba realmente a una disminución de la mitofagia, estudiamos en nuestra serie su interacción con PINK1 en las muestras de AAA y en el grupo control. Los resultados fueron acordes, encontrándose una menor interacción PINK1-parkin en el grupo de AAA frente al grupo control, lo que confirma la existencia de una menor mitofagia en el AAA. Esto puede llevar al acúmulo de mitocondrias tóxicas y disfuncionantes, con menor producción de ATP, exceso de estrés oxidativo y una eventual muerte celular.

En nuestro conocimiento, no se ha descrito previamente en la literatura el papel de la mitofagia en la patogénesis del AAA. Sí se ha estudiado en la enfermedad cardiovascular, de forma que la capacidad de eliminar mitocondrias dañadas o disfuncionantes se ha demostrado protectora frente al estrés en los miocardiocitos. De hecho, se ha observado que la mitofagia

es indispensable para la adaptación de los miocardiocitos al ciclo cardiaco (193). Además, la disminución en la interacción PINK1-Parkin se ha visto relacionada con la disfunción miocárdica (194). Modelos experimentales knockout para PINK1 desarrollaron disfunción ventricular temprana con hipertrofia compensadora (195). En humanos, los estudios de pacientes con disfunción miocárdica avanzada han mostrado un exceso de estrés oxidativo y una expresión disminuida de PINK1 (195).

Otro mecanismo por el que la mitofagia puede jugar un papel importante en el desarrollo de AAA es el mediado por el exceso de inflamación y de estrés oxidativo. Se ha observado que un aclaramiento insuficiente de mitocondrias dañadas puede activar en exceso las señales pro-inflamatorias (196,197). En este sentido, las mitocondrias disfuncionantes no eliminadas causarían la activación de la respuesta inmune y un exceso de ROS mitocondriales y ambas activarían la caspasa-1, la cual, además de activar aún más el proceso inflamatorio, inhibiría la mitofagia, potenciando el problema. De esta forma, el correcto funcionamiento mitocondrial, con la mitofagia como mecanismo regulador principal, tiene un papel crucial en limitar la excesiva activación del sistema inmune innato, el cual se ha relacionado con la progresión del AAA (39). Además, el estrés oxidativo empeora los procesos inflamatorios por inducción de citoquinas pro-inflamatorias, contribuyendo a la progresión de muchas enfermedades asociadas a la edad (198). La elevación de biomarcadores inflamatorios, como la proteína C reactiva, en sangre de pacientes con AAA apoya el papel de la inflamación en la patogenia de los AAA (59).

## **2. COAGULACIÓN Y FACTOR Xa EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL. EFECTOS DEL RIVAROXABÁN SOBRE LA PARED ANEURISMÁTICA.**

Como se ha expuesto con mayor detalle en la introducción, el TIL presente en los AAA incluidos en nuestro estudio, se ha demostrado que influye en la debilidad de la pared aórtica, considerándose para la mayoría de autores un factor de riesgo de crecimiento y rotura (41,127,128,199,200).

Los niveles elevados de factor tisular (FT), complejo trombina – antitrombina III, fibrinógeno y dímero D encontrados en el plasma de pacientes con AAA con TIL sugieren la existencia de una continua activación de la cascada de la coagulación y de la fibrinólisis en el TIL (55,56). Además, se ha observado que este aumento puede estar presente hasta 10 - 20 años antes del desarrollo del AAA, por lo que la regulación de la hemostasia / fibrinólisis podría estar implicada en los estadios iniciales de la enfermedad (128). Este continuo remodelado del TIL, con depósito y posterior degradación de fibrina, va a promover la inflamación aórtica y el estado proteolítico presentes en el AAA.

En el estudio del TIL realizado anteriormente por nuestro grupo de trabajo se objetivó una expresión muy aumentada de FXa en las muestras de AAA con respecto a la de aortas no aneurismáticas obtenidas de donantes (122). Ello es debido a la activación de la cascada de la coagulación pero, también, a la activación plaquetaria que se produce en la región luminal del TIL, fuente importante de FXa (139,140). En consecuencia, las células de la pared vascular se encuentran expuestas de forma crónica a concentraciones elevadas de FXa. Apoyando la posible implicación del TIL y del FXa en el AAA, un estudio reciente ha objetivado que el

porcentaje de TIL y los niveles plasmáticos de FXa de pacientes con AAA tienen una correlación con el diámetro aórtico máximo y, por tanto, con la severidad del AAA (201).

Pese al importante papel de la activación plaquetaria, y a pesar de la utilización de antiagregantes en el AAA como estrategia de prevención secundaria de enfermedades cardiovasculares, los estudios clínicos retrospectivos realizados hasta la fecha no han demostrado ningún beneficio de estos fármacos en la historia natural del AAA humano (125). Asimismo, no existe hasta el momento ninguna terapia médica que se haya demostrado eficaz en modificar la historia natural del AAA.

Continuando con el estudio del FXa, la evidencia acumulada indica que, además de su papel central en la formación del coágulo, ejerce otras funciones sobre la pared vascular. Se ha documentado que su activación tiene efectos pro-inflamatorios, proteolíticos y sobre el metabolismo energético mitocondrial y el estrés oxidativo. Estos efectos son independientes de la coagulación y parecen estar mediados por receptores de proteasas activadas (PAR-1 y PAR-2) presentes en células endoteliales, CML y fibroblastos (132,136). De este modo, la activación del FX puede tener un efecto patogénico en el desarrollo de enfermedades vasculares.

En esta línea, trabajos sobre venas safenas han demostrado que una inhibición del FXa puede modificar la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo en las CML de la pared vascular (136). En la aterosclerosis, Hara et al. (135) demostraron en modelos experimentales murinos que la inhibición del FXa con rivaroxabán frenaba la progresión de la placa aterosclerótica, al reducirse la activación de macrófagos pro-inflamatorios. También, en

arterias femorales de pacientes diabéticos, se ha observado que el FXa promueve cambios en la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo energético, en concreto con la glucólisis, lo que sugiere que el FXa puede alterar el metabolismo mitocondrial lo que se acompaña con un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (137). Por lo tanto, estos datos apoyan un efecto del FXa sobre la pared vascular, independiente de su actividad pro-coagulante, por interferir en el estrés oxidativo, la inflamación y el metabolismo mitocondrial.

Estos efectos, independientes de la coagulación, también se han objetivado al estudiar la inhibición del FXa en otras estirpes celulares. Así, la utilización de rivaroxabán en células hepáticas de ratas conseguía reducir la inflamación mediada por el estrés oxidativo (202) y resultaba también eficaz en la prevención de los efectos cardiotóxicos del sunitinib (203), en modelos experimentales murinos. En humanos, se ha demostrado el efecto antioxidante del edoxabán (inhibidor selectivo del FXa) en el estudio *in vitro* sobre células tubulares renales, pudiendo frenar la inflamación y la fibrosis que se produce en la progresión de la insuficiencia renal (204). Asimismo, el tratamiento de la fibrilación auricular con rivaroxabán o apixabán (inhibidor selectivo del FXa) se asocia a una reducción de los marcadores sanguíneos pro-inflamatorios, de forma independiente a su indicación como anticoagulante (205).

En el AAA también se ha objetivado un posible papel del FXa en su patogenia. Moran CS et al. (138), en su estudio sobre modelos murinos Apo E -/- infundidos con angiotensina para el desarrollo de AAA, objetivaron un efecto protector sobre la formación o severidad de los AAA en aquellos tratados durante 14 días con enoxaparina (heparina de bajo peso molecular que inhibe el FXa) o fondaparinux (inhibidor selectivo del FXa). La enoxaparina

---

causó una reducción en el diámetro aórtico comparado con el grupo control. El fondaparinux redujo la expresión de PAR-2, de la MMP-2, la fragmentación de elastina, la infiltración monocito / macrofágica de la pared aórtica y causó también una reducción en el diámetro aórtico comparado con el grupo control. No obstante, este efecto protector no se encontró si la inhibición de la coagulación se ejercía sobre el factor II activado mediante el tratamiento con dabigatrán, lo que puede indicar que el efecto observado se debe a la inhibición del propio FXa y no de la cascada de la coagulación.

En muestras de AAA humanos, *Moñux G et al.* (122) demostraron por primera vez que la inhibición del FXa con rivaroxabán reducía la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y con el estrés oxidativo (actuando sobre subunidades de la NADPH oxidasa citosólica y mitocondrial) en la pared aneurismática hasta valores similares a los objetivados en los controles. De forma congruente, *Ding Y et al.* (201) han observado recientemente en modelos animales y en el estudio *in vitro* de muestras de AAA humano que el efecto protector del rivaroxabán sobre el AAA se debe, al menos en parte, a un bloqueo de las citoquinas proinflamatorias y a la disminución en la expresión de MMP-2 favorecidas por el FXa. Por lo tanto, el rivaroxabán protegería contra la progresión del AAA y su beneficio estaría asociado a una inhibición de la inflamación de la pared aórtica y a un menor remodelado de la misma.

### **2.1.Efecto del rivaroxabán en la homeostasis y funcionalidad mitocondrial.**

El efecto de la inhibición del FXa con rivaroxabán sobre las mitocondrias fue estudiado por *Samiei F et al.* (206) en células renales murinas, concluyendo que dosis altas de rivaroxabán protegían frente al estrés oxidativo y frente a la toxicidad mitocondrial. Estas observaciones resultan congruentes con nuestros resultados, en los que también se encontró

un efecto protector del rivaroxabán frente a la toxicidad mitocondrial.

En nuestro estudio, la incubación *in vitro* de las muestras aneurismáticas con rivaroxabán produjo un aumento significativo en la actividad enzimática de la citrato sintasa y de la COX. Estas observaciones sugieren que el FXa endógeno puede encontrarse involucrado en la disfunción mitocondrial y en los cambios en el metabolismo energético que se han observado en los AAA y que el rivaroxabán podría mejorar esta alteración. Es importante remarcar que la mejora en la actividad de estas enzimas mitocondriales con el rivaroxabán no se debe a cambios en el número de células incluidas en cada muestra de pared aórtica, ya que el contenido en ADN fue medido y las muestras aneurismáticas incubadas con y sin rivaroxabán contaban con una densidad celular similar.

El contenido en Drp1, elevado en muestras de AAA, también se redujo tras la incubación con rivaroxabán. Una observación interesante fue que en el contenido citosólico de Drp1 fosforilado en Ser637 era incluso mayor en las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán que en las aortas de control. Esta observación puede sugerir un efecto del rivaroxabán para mantener Drp1 fosforilado en Ser637 independiente de su actividad como inhibidor del FXa endógeno, como ya se ha postulado en trabajos previos. Moñux G et al. (122) obtuvieron en las muestras de AAA cultivadas con rivaroxabán un aumento de IL-10 a niveles incluso más altos que en las aortas control no aneurismáticas. Asimismo, López-Farré AJ et al. (137) observaron que, en arterias femorales superficiales de pacientes diabéticos, pese a que el FXa no modifica la expresión de proteínas relacionadas con la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, el rivaroxabán sí aumentaba dicha expresión, lo que podría ser por un efecto independiente a la inhibición del FXa. Pese a que no se han encontrado metabolitos

activos del rivaroxabán capaces de inhibir el FXa en humanos, sí se han descrito metabolitos del rivaroxabán secundarios a la degradación oxidativa del resto morfolinilo y a la hidrólisis de sus enlaces amida (143). Es necesario investigar si estos metabolitos pudieran tener efectos biológicos independientemente de la inhibición del FXa. Otra posibilidad es que en las aortas control se produzca algunos niveles de FXa que podrían ser inhibidos por rivaroxabán. No obstante, en los estudios previos de nuestro grupo de trabajo, el FXa no fue detectado en la aorta no aneurismática procedente de los donantes de órganos (122).

Por otro lado, la incubación de las muestras aneurismáticas con rivaroxabán revirtió de forma significativa la disminución en la expresión de parkin y en la interacción PINK1-parkin observada en las muestras cultivadas sin fármaco. Estos resultados sugieren que el FXa endógeno puede estar involucrado en la disminución de la mitofagia observada en el AAA. Por su parte, el rivaroxabán podría devolver a las células su capacidad de mitofagia, como control de calidad mitocondrial, para evitar el acúmulo de mitocondrias tóxicas que puede llevar al exceso de ROS y a la muerte celular.

### **3. LIMITACIONES, FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN Y COMENTARIOS FINALES.**

La primera limitación de la presente tesis doctoral es su pequeño tamaño muestral. Esto es debido principalmente a la dificultad en la obtención de muestras de pared aórtica en donantes, así como al gran aporte de recursos que supone una muestra adicional en estudios *in vitro*. No obstante, con la muestra obtenida nuestros resultados han sido consistentes y el análisis entre grupos estadísticamente significativo. Por lo tanto, aunque debe considerarse como un análisis piloto, abre nuevos conceptos inexplorados sobre el papel de FXa en el AAA.

Es importante remarcar de nuevo que los valores obtenidos como control deben entenderse como una aproximación a los valores normales, fundamentalmente por el obligado anonimato existente en las donaciones, lo cual no permite conocer datos relativos a la comorbilidad o a la toma de medicación habitual. Asimismo, con respecto a la edad, los donantes eran más jóvenes que los pacientes del grupo de AAA, por lo que no es posible descartar que el factor edad pueda influir en algunos cambios de los parámetros mitocondriales estudiados. Sin embargo, el estudio comparativo de las muestras de AAA incubadas en ausencia y presencia de rivaroxabán, al tratarse de la misma muestra, sí permite analizar que el FXa endógeno podría estar involucrado en los cambios mitocondriales observados en el AAA. En cualquier caso, se necesitan estudios específicos adicionales para analizar la influencia de la edad en la biogénesis y dinámica mitocondrial de los AAA.

Otra de las limitaciones es que todas las muestras de AAA incluidos contaban con TIL con lo que, aunque no se incluyó el trombo en el análisis y sólo fue incubada la pared aórtica, existirían AAA no representados. La elección de los AAA con trombo se realizó por ser, con mucho, los más frecuentes, representando en torno al 75% del total. Con el propósito de estudiar si estos hallazgos se encuentran presentes en todos los AAA, nuestro grupo de trabajo está llevando a cabo actualmente estudios comparativos con muestras de AAA sin TIL.

Además, no se determinaron los mecanismos moleculares por los cuales el rivaroxabán modificó los parámetros mitocondriales descritos. En estudios previos de nuestro grupo se ha estudiado que el rivaroxabán disminuía la inflamación y el estrés oxidativo en la pared aneurismática, pudiendo ser los desencadenantes de las modificaciones en la funcionalidad mitocondrial o actuar por mecanismos independientes. Se precisan estudios futuros para

aclarar en profundidad los mecanismos moleculares que hacen que la inhibición del FXa pueda proteger a la mitocondria frente al desarrollo de AAA.

Por último, los resultados obtenidos se han realizado únicamente con rivaroxabán y con una concentración fija de 50nmol/L, que equivale a la alcanzada en sangre en pacientes con una dosis de 20mg de rivaroxabán diaria. Se precisaría de nuevos estudios, para conocer si dosis menores de este fármaco o de otros inhibidores del FXa podrían tener efectos similares en la patogenia del AAA.

En definitiva, hemos observado que en los AAA humanos, el mantenimiento de la función y homeostasis mitocondrial podría ser una estrategia en el tratamiento del AAA. El rivaroxabán mejoró la funcionalidad mitocondrial probablemente por la mejoría en la mitofagia, como mecanismo de control de la calidad mitocondrial. Por lo tanto, estas observaciones ponen de manifiesto la existencia de posibles mecanismos de acción celular inexplorados para FXa en el contexto del AAA humano y sitúan al rivaroxabán como un fármaco prometedor para modificar su historia natural. No obstante, se precisan de más estudios preclínicos y de ensayos clínicos prospectivos para confirmar estas suposiciones.

---

*“Lo que sabemos es una gota de agua,  
lo que ignoramos es el océano”*

*Isaac Newton*

## CONCLUSIONES



## **X. CONCLUSIONES.**

1. Existe en el aneurisma de aorta abdominal una disfunción mitocondrial, objetivada por una menor actividad enzimática de la citrato sintasa y de la citocromo C oxidasa en relación a las muestras de aorta sana. Ambas enzimas resultan esenciales para el correcto funcionamiento mitocondrial. Además, la reducción en la actividad de la citrato sintasa se correlacionó de forma directa con el diámetro aórtico.
2. Existe en el aneurisma de aorta abdominal un exceso de fisión mitocondrial con respecto a la aorta sana, aumentando la expresión de Drp1 mitocondrial y disminuyendo el Drp1 citosólico fosforilado en Ser637 (inactivo) en el aneurisma con respecto a la pared aórtica sana.
3. La mitofagia se encuentra reducida en el aneurisma de aorta abdominal, con disminución en la expresión de parkin y en la interacción PINK1-parkin. Ello conduce a un acúmulo de mitocondrias dañadas con respecto a las muestras control en las que existe un correcto funcionamiento de este mecanismo de calidad mitocondrial con una mayor expresión de parkin y mayor interacción PINK1-parkin.
4. El rivaroxabán revirtió la disfunción mitocondrial observada en el aneurisma, aumentando la actividad enzimática de la citrato sintasa y de la citocromo C oxidasa hasta niveles similares a los encontrados en las aortas no aneurismáticas.
5. El rivaroxabán redujo significativamente la expresión de Drp1 mitocondrial, disminuyendo el exceso de fisión mitocondrial observado en el aneurisma de aorta

abdominal hasta niveles similares a los obtenidos en las aortas control.

6. El rivaroxabán revirtió los efectos sobre la mitofagia observados en el aneurisma de aorta abdominal, aumentando la expresión de parkin y la interacción PINK1-parkin hasta niveles similares a los de las aortas control.

# BIBLIOGRAFÍA



## **XI. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for Cardiovascular. *J Vasc Surg.* 1991 Mar;13(3):452–8.
2. Bengtsson H, Sonesson B BD. Incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms, estimated by necropsy studies and population screening by ultrasound. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:1–24.
3. McGregor JC, Pollock JG AH. The value of ultrasonography in the diagnosis of abdominal aortic aneurysm. *Scott Med J.* 1975;20:133–37.
4. Lahoz C, Gracia CE, García LR, Montoya SB, Hernando ÁB, Heredero ÁF, et al. SEA-SEACV 2015: Guía para el diagnóstico y tratamiento del aneurisma de aorta abdominal. *Clínica e Investig en Arterioscler.* 2016;28(Supl 1):1–49.
5. Li X, Zhao G, Zhang J, Duan Z, Xin S. Prevalence and trends of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population - a meta-analysis. *PLoS One.* 2013 Dec 2;8(12):e81260.
6. Sampson UKA, Norman PE, Fowkes FGR, Aboyans V, Song Y, Harrell FE, et al. Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. *Glob Heart.* 2014 Mar;9(1):159–70.
7. Sidloff D, Stather P, Dattani N, Bown M, Thompson J, Sayers R, et al. Aneurysm global epidemiology study: public health measures can further reduce abdominal aortic aneurysm mortality. *Circulation.* 2014 Feb;129(7):747–53.
8. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical management of small abdominal aortic

- 
- aneurysms. *Circulation*. 2008 Apr 8;117(14):1883–9.
9. Chaikof EL, Dalman RL, Eskandari MK, Jackson BM, Lee WA, Mansour MA, et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2018 Jan;67(1):2-77.e2.
  10. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: Pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2605–13.
  11. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2009 Jan;49(1):47–50; discussion 51.
  12. van de Luijngaarden KM, Bastos Gonçalves F, Hoeks SE, Valentijn TM, Stolker RJ, Majoor-Krakauer D, et al. Lower atherosclerotic burden in familial abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2014 Mar;59(3):589–93.
  13. van Vlijmen-van Keulen CJ, Pals G, Rauwerda JA. Familial abdominal aortic aneurysm: a systematic review of a genetic background. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2002 Aug;24(2):105–16.
  14. Kuivaniemi H, Ryer EJ, Elmore JR, Tromp G. Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015;13(9):975–87.
  15. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. 2010 Sep;52(3):539–48.
  16. Stackelberg O, Björck M, Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Fruit and Vegetable Consumption With Risk of Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation*. 2013 Aug 20;128(8):795–802.

17. Stackelberg O, Björck M, Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Alcohol Consumption, Specific Alcoholic Beverages, and Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation*. 2014 Aug 19;130(8):646–52.
18. Myers J, Mcelrath M, Jaffe A, Smith K, Fonda H, Vu A, et al. A Randomized Trial of Exercise Training in Abdominal Aortic Aneurysm Disease. *Med Sci Sport Exerc*. 2014 Jan;46(1):2–9.
19. Brady AR, Thompson SG, Fowkes FGR, Greenhalgh RM, Powell JT, UK Small Aneurysm Trial Participants. Abdominal Aortic Aneurysm Expansion. *Circulation*. 2004 Jul 6;110(1):16–21.
20. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT, RESCAN collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*. 2012 May;99(5):655–65.
21. Golledge J, Moxon J, Pinchbeck J, Anderson G, Rowbotham S, Jenkins J, et al. Association between metformin prescription and growth rates of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*. 2017;104(11):1486–93.
22. Kniemeyer HW, Kessler T, Reber PU, Ris HB, Hakki H, Widmer MK. Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Feb;19(2):190–6.
23. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Ballard DJ, Jordan WD, Blebea J, et al. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA*. 2002 Jun 12;287(22):2968–72.
24. Hall AJ, Busse EFG, McCarville DJ, Burgess JJ. Aortic Wall Tension as a Predictive Factor for Abdominal Aortic Aneurysm Rupture: Improving the Selection of Patients

- 
- for Abdominal Aortic Aneurysm Repair. *Ann Vasc Surg.* 2000 Mar;14(2):152–7.
25. Fillinger MF, Raghavan ML, Marra SP, Cronenwett JL, Kennedy FE. In vivo analysis of mechanical wall stress and abdominal aortic aneurysm rupture risk. *J Vasc Surg.* 2002;36(3):589–97.
26. Raaz U, Zöllner AM, Schellinger IN, Toh R, Nakagami F, Brandt M, et al. Segmental Aortic Stiffening Contributes to Experimental Abdominal Aortic Aneurysm Development. *Circulation.* 2015 May 19;131(20):1783–95.
27. Vorp DA, Vande Geest JP. Biomechanical determinants of abdominal aortic aneurysm rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1558–66.
28. Courtois A, Nusgens BV, Hustinx R, Namur G, Gomez P, Somja J, et al. 18F-FDG uptake assessed by PET/CT in abdominal aortic aneurysms is associated with cellular and molecular alterations prefacing wall deterioration and rupture. *J Nucl Med.* 2013;54(10):1740–7.
29. Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(5):466–9.
30. Xenos M, Labropoulos N, Rambhia S, Alemu Y, Einav S, Tassiopoulos A, et al. Progression of Abdominal Aortic Aneurysm Towards Rupture: Refining Clinical Risk Assessment Using a Fully Coupled Fluid–Structure Interaction Method. *Ann Biomed Eng.* 2015;43(1):139–53.
31. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate Repair Compared with Surveillance of Small Abdominal Aortic Aneurysms. *N Engl J Med.* 2002 May 9;346(19):1437–44.
32. RESCAN Collaborators, Bown MJ, Sweeting MJ, Brown LC, Powell JT, Thompson

- SG. Surveillance Intervals for Small Abdominal Aortic Aneurysms. *JAMA*. 2013 Feb 27;309(8):806.
33. Brown PM, Zelt DT, Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: The impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg*. 2003 Feb;37(2):280–4.
34. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999 Sep;230(3):289–96; discussion 296-7.
35. Norman PE, Powell JT. Abdominal Aortic Aneurysm. *Circulation*. 2007 Jun 5;115(22):2865–9.
36. Rawla P, El Helou ML, Vellipuram AR. Fluoroquinolones and the Risk of Aortic Aneurysm or Aortic Dissection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2019;17(1):3–10.
37. Dattilo JB, Makhoul R. Biology of the arterial wall. *J Vasc Surg*. 2000 Aug;32(2):410.
38. Aird WC. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circ Res*. 2007 Feb 2;100(2):158–73.
39. Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, et al. Abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Dis Prim*. 2018;4(1).
40. Dobrin PB. Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media. *Hypertension*. 1999 Mar;33(3):806–10.
41. Kazi M, Thyberg J, Religa P, Roy J, Eriksson P, Hedin U, et al. Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg*. 2003 Dec;38(6):1283–92.
42. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall

- 
- weakening. *J Vasc Surg.* 2001 Aug;34(2):291–9.
43. Michel J-B, Martin-Ventura J-L, Egido J, Sakalihan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011 Apr 1;90(1):18–27.
44. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WRW, Sayed S, Loftus IM, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Sep;26(9):2077–82.
45. Fink HA, Lederle FA, Roth CS, Bowles CA, Nelson DB, Haas MA. The accuracy of physical examination to detect abdominal aortic aneurysm. *Arch Intern Med.* 2000 Mar 27;160(6):833–6.
46. Lynch RM. Accuracy of abdominal examination in the diagnosis of non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *Accid Emerg Nurs.* 2004 Apr;12(2):99–107.
47. Wanhainen A, Verzini F, Van Herzele I, Allaire E, Bown M, Cohnert T, et al. Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019;57(1):8–93.
48. Lindholt JS, Vammen S, Juul S, Henneberg EW, Fasting H. The validity of ultrasonographic scanning as screening method for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999 Jun;17(6):472–5.
49. Guirguis-Blake JM, Beil TL, Senger CA, Whitlock EP. Ultrasonography Screening for Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2014 Mar 4;160(5):321.
50. Long A, Rouet L, Lindholt JS, Allaire E. Measuring the maximum diameter of native

- abdominal aortic aneurysms: Review and critical analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;43(5):515–24.
51. Scott RA, Ashton HA, Kay DN. Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years. *Br J Surg.* 1991 Sep;78(9):1122–5.
52. Singh K, Jacobsen B., Solberg S, Bønaa KH, Kumar S, Bajic R, et al. Intra- and interobserver variability in the measurements of abdominal aortic and common iliac artery diameter with computed tomography. The Tromsø study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003 May;25(5):399–407.
53. Evangelista A. Imaging aortic aneurysmal disease. *Heart.* 2014 Jun 15;100(12):909–15.
54. Goshima S, Kanematsu M, Kondo H, Kawada H, Kojima T, Sakurai K, et al. Preoperative planning for endovascular aortic repair of abdominal aortic aneurysms: feasibility of nonenhanced MR angiography versus contrast-enhanced CT angiography. *Radiology.* 2013 Jun;267(3):948–55.
55. Sidloff DA, Stather PW, Choke E, Bown MJ, Sayers RD. A systematic review and meta-analysis of the association between markers of hemostasis and abdominal aortic aneurysm presence and size. *J Vasc Surg.* 2014;59(2):528-535.e4.
56. Kotschy M, Witkiewicz W, Grendziak R, Dubis J, Zapotoczny N, Kotschy D. Selected clotting factors in blood of patients with abdominal aortic aneurysms. *Kardiol Pol.* 2012;70(6):574–9.
57. Golledge J, Muller R, Clancy P, McCann M, Norman PE. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of plasma D-dimer for abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J.* 2011;32(3):354–64.
58. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of AAA presence

- and progression. 2009;118(23):2382–92.
59. Folsom AR, Yao L, Alonso A, Lutsey PL, Missov E, Lederle FA, et al. Circulating Biomarkers and Abdominal Aortic Aneurysm Incidence: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*. 2015 Aug;132(7):578–85.
  60. Stather PW, Sidloff DA, Dattani N, Gokani VJ, Choke E, Sayers RD, et al. Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2014 Oct;101(11):1358–72.
  61. Cosford PA, Leng GC. Screening for abdominal aortic aneurysm. *Cochrane database Syst Rev*. 2007 Apr;(2):CD002945.
  62. Scott RAP, Ashton HA, Buxton MJ, Day NE, Kim LG, Marteau TM, et al. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9345):1531–9.
  63. Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM, Le MTQ, Spencer CA, Tuohy RJ, et al. Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *Br Med J*. 2004;329(7477):1259–62.
  64. Lindholt JS, Sogaard R. Population screening and intervention for vascular disease in Danish men (VIVA): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;390(10109):2256–65.
  65. Thompson S, Brown L, Sweeting M, Bown M, Kim L, Glover M, et al. Systematic review and meta-analysis of the growth and rupture rates of small abdominal aortic aneurysms: implications for surveillance intervals and their cost-effectiveness. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2013 Sep;17(41):1–118.
  66. Kokje VBC, Hamming JF, Lindeman JHN. Editor's Choice - Pharmaceutical Management of Small Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review of the

- Clinical Evidence. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50(6):702–13.
67. Rughani G, Robertson L, Clarke M. Medical treatment for small abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012 Sep 12;(9):CD009536.
68. Baxter BT, Matsumura J, Curci JA, McBride R, Larson L, Blackwelder W, et al. Effect of Doxycycline on Aneurysm Growth Among Patients With Small Infrarenal Abdominal Aortic Aneurysms: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2020 May;323(20):2029–38.
69. Bicknell CD, Kiru G, Falaschetti E, Powell JT, Poulter NR, Ashby D, et al. An evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the growth rate of small abdominal aortic aneurysms: A randomized placebo-controlled trial (AARDVARK). *Eur Heart J.* 2016;37(42):3213–21.
70. Wanhainen A, Mani K, Kullberg J, Svensjö S, Bersztel A, Karlsson L, et al. The effect of ticagrelor on growth of small abdominal aortic aneurysms—a randomized controlled trial. *Cardiovasc Res.* 2020 Feb;116(2):450–6.
71. Golledge J, Moxon J V., Singh TP, Bown MJ, Mani K, Wanhainen A. Lack of an effective drug therapy for abdominal aortic aneurysm. *J Intern Med.* 2020;288(1):6–22.
72. Bahia SS, Vidal-Diez A, Seshasai SRK, Shpitser I, Brownrigg JR, Patterson BO, et al. Cardiovascular risk prevention and all-cause mortality in primary care patients with an abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2016;103(12):1626–33.
73. Ulug P, Powell JT, Martinez MAM, Ballard DJ, Filardo G. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Jul 1;7(7):CD001835.
74. Ulug P, Sweeting MJ, von Allmen RS, Thompson SG, Powell JT, Ulug P, et al. Morphological suitability for endovascular repair, non-intervention rates, and operative

- 
- mortality in women and men assessed for intact abdominal aortic aneurysm repair: systematic reviews with meta-analysis. *Lancet*. 2017;389(10088):2482–91.
75. Haveman JW, Karliczek A, Verhoeven ELG, Tielliu IFJ, de Vos R, Zwaveling JH, et al. Results of streamlined regional ambulance transport and subsequent treatment of acute abdominal aortic aneurysms. *Emerg Med J*. 2006 Oct 1;23(10):807–10.
76. Salhab M, Farmer J, Osman I. Impact of Delay on Survival in Patients with Ruptured Abdominal Aortic Aneurysm. *Vascular*. 2006 Jan 23;14(1):38–42.
77. Ten Bosch JA, Koning SW, Willigendael EM, VAN Sambeek MR, Stokmans RA, Prins MH, et al. Symptomatic abdominal aortic aneurysm repair: to wait or not to wait. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2016 Dec;57(6):830–8.
78. Tambyraja AL, Raza Z, Stuart WP, Murie JA, Chalmers RTA. Does immediate operation for symptomatic non-ruptured abdominal aortic aneurysm compromise outcome? *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;28(5):543–6.
79. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GPS, Powell JT, Thompson SG, EVAR trial participants. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004 Sep;364(9437):843–8.
80. Blankensteijn JD, de Jong SECA, Prinssen M, van der Ham AC, Buth J, van Sterkenburg SMM, et al. Two-Year Outcomes after Conventional or Endovascular Repair of Abdominal Aortic Aneurysms. *N Engl J Med*. 2005;352(23):2398–405.
81. Lederle FA, Freischlag JA, Kyriakides TC, Matsumura JS, Padberg FT, Kohler TR, et al. Long-term comparison of endovascular and open repair of abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med*. 2012 Nov 22;367(21):1988–97.
82. Becquemin JP, Pillet JC, Lescalie F, Sapoval M, Goueffic Y, Lermusiaux P, et al. A

- randomized controlled trial of endovascular aneurysm repair versus open surgery for abdominal aortic aneurysms in low- to moderate-risk patients. *J Vasc Surg.* 2011;53(5):1167-1173.e1.
83. Powell JT, Sweeting MJ, Ulug P, Blankensteijn JD, Lederle FA, Becquemin J-P, et al. Meta-analysis of individual-patient data from EVAR-1, DREAM, OVER and ACE trials comparing outcomes of endovascular or open repair for abdominal aortic aneurysm over 5 years. *Br J Surg.* 2017 Feb;104(3):166–78.
84. Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayashi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation.* 1992 Jan;85(1):205–11.
85. Sangjera SS, Hingorani A TM. Etiology of abdominal aortic aneurysms. In: Ascher E, Veith FJ, Gloviczki P E, editor. *Haimovici's vascular surgery.* Wiley-Blackwell, Oxford, UK; 2012. p. 221–32.
86. Tilson MD. Aortic aneurysms and atherosclerosis. *Circulation.* 1992 Jan;85(1):378–9.
87. Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Sep 1;23(9):1621–6.
88. Lederle FA. The strange relationship between diabetes and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012 Mar;43(3):254–6.
89. Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999;99(1):96–104.
90. Lindeman JHN, Abdul-Hussien H, Schaapherder AFM, Van Bockel JH, Von der Thüsen JH, Roelen DL, et al. Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-

- 
- dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm. *Clin Sci (Lond)*. 2008 Jun 1;114(11):687–97.
91. Wolinsky H GS. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res*. 1969;25(6):677–86.
92. Zarins CK, Glagov S, Vesselinovitch D, Wissler RW. Aneurysm formation in experimental atherosclerosis: relationship to plaque evolution. *J Vasc Surg*. 1990 Sep;12(3):246–56.
93. Wills A, Thompson MM, Crowther M SRbP. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms - cellular and biochemical mechanisms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996;12:391–400.
94. 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 Aug;15(8):1145–51.
95. Saratzis A, Bown MJ. The genetic basis for aortic aneurysmal disease. *Heart*. 2014 Jun;100(12):916–22.
96. Meijer CA, Kokje VBC, van Tongeren RBM, Hamming JF, van Bockel JH, Möller GM, et al. An Association between Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Abdominal Aortic Aneurysm beyond Smoking. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012 Aug;44(2):153–7.
97. Kamenskiy A V, Dzenis YA, Kazmi SAJ, Pemberton MA, Pipinos II, Phillips NY, et al. Biaxial mechanical properties of the human thoracic and abdominal aorta, common carotid, subclavian, renal and common iliac arteries. *Biomech Model Mechanobiol*. 2014 Nov 8;13(6):1341–59.
98. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific

- Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation*. 2008 Sep 16;118(12):1276–84.
99. Boddy AM, Lenk GM, Lillvis JH, Nischan J, Kyo Y, Kuivaniemi H. Basic research studies to understand aneurysm disease. *Drug News Perspect*. 2008 Apr;21(3):142–8.
100. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110(5):625–32.
101. Quintana RA, Taylor WR. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res*. 2019 Feb 15;124(4):607–18.
102. Yuan Z, Lu Y, Wei J, Wu J, Yang J, Cai Z. Abdominal Aortic Aneurysm: Roles of Inflammatory Cells. *Front Immunol*. 2021 Feb 3;11:1–12.
103. Eskandari MK, Vijungco JD, Flores A, Borensztajn J, Shively V, Pearce WH. Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice<sup>1</sup>. *J Surg Res*. 2005 Feb;123(2):289–93.
104. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced Atherosclerotic Plaque but Enhanced Aneurysm Formation in Mice With Inactivation of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Gene. *Circ Res*. 2002 May 3;90(8):897–903.
105. Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation*. 1997 Jan 7;95(1):205–12.
106. Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery*. 1997 Aug;122(2):262–4.
107. Wang Q, Liu Z, Ren J, Morgan S, Assa C, Liu B. Receptor-interacting protein kinase 3

- 
- contributes to abdominal aortic aneurysms via smooth muscle cell necrosis and inflammation. *Circ Res.* 2015 Feb;116(4):600–11.
108. Meilhac O, Ho-Tin-Noé B, Houard X, Philippe M, Michel J-B, Anglés-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J.* 2003 Jul;17(10):1301–3.
109. Sukhova GK, Shi G-P. Do cathepsins play a role in abdominal aortic aneurysm pathogenesis? *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Nov;1085:161–9.
110. Dobrin PB. Pathophysiology and pathogenesis of aortic aneurysms. Current concepts. *Surg Clin North Am.* 1989 Aug;69(4):687–703.
111. López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 1997 Mar;150(3):993–1007.
112. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. 2005;
113. Hirose H, Tilson MD. Abdominal Aortic Aneurysm As an Autoimmune Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:416–8.
114. Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory Cell Phenotypes in AAAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 Aug;35(8):1746–55.
115. Eagleton MJ. <http://vas.sagepub.com/> Inflammation in abdominal aortic aneurysms: cellular infiltrate and cytokine profiles. 2012.
116. Platsoucas CD, Lu S, Nwaneshiudu I, Solomides C, Agelan A, Evans K, et al. Abdominal Aortic Aneurysm Is a Specific Antigen-Driven T Cell Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:224–35.
117. Lawrence DM, Singh RS, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Rapamycin suppresses experimental aortic aneurysm growth. *J Vasc Surg.* 2004 Aug;40(2):334–8.

118. Dobrin P, Baumgartner N, Anidjar S, Chejfec G, Mrkvicka R. Inflammatory Aspects of Experimental Aneurysms: Effect of Methylprednisolone and Cyclosporine. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:74–88.
119. Lenk GM, Tromp G, Weinsheimer S, Gatalica Z, Berguer R, Kuivaniemi H. Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Genomics.* 2007;8(1):237.
120. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar;27(3):461–9.
121. Miller FJJ, 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 Apr;22(4):560–5.
122. Moñux G, Zamorano-León JJ, Marqués P, Sopena B, García-García JM, Laich de Koller G, et al. FXa inhibition by rivaroxaban modifies mechanisms associated with the pathogenesis of human abdominal aortic aneurysms. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;83(12):2661–70.
123. Emeto TI, Moxon J V., Au M, Golledge J. Oxidative stress and abdominal aortic aneurysm: Potential treatment targets. *Clin Sci.* 2016;130(5):301–15.
124. Xiong W, Mactaggart J, Knispel R, Worth J, Zhu Z, Li Y, et al. Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis.* 2009;202(1):128–34.
125. Cameron SJ, Russell HM, Phillip Owens A. Antithrombotic therapy in abdominal aortic aneurysm: Beneficial or detrimental? *Blood.* 2018;132(25):2619–28.
126. Koole D, Zandvoort HJA, Schoneveld A, Vink A, Vos JA, Van Den Hoogen LL, et al.

- 
- Intraluminal abdominal aortic aneurysm thrombus is associated with disruption of wall integrity. *J Vasc Surg.* 2013;57(1):77–83.
127. Parr A, McCann M, Bradshaw B, Shahzad A, Buttner P, Golledge J. Thrombus volume is associated with cardiovascular events and aneurysm growth in patients who have abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2011;53(1):28–35.
128. Piechota-Polanczyk A, Jozkowicz A, Nowak W, Eilenberg W, Neumayer C, Malinski T, et al. The Abdominal Aortic Aneurysm and Intraluminal Thrombus: Current Concepts of Development and Treatment. *Front Cardiovasc Med.* 2015;2(May):1–14.
129. Modrego J, López-Farré AJ, Martínez-López I, Muela M, MacAya C, Serrano J, et al. Expression of cytoskeleton and energetic metabolism-related proteins at human abdominal aortic aneurysm sites. *J Vasc Surg.* 2012;55(4):1124–33.
130. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth.* 2014 Sep;58(5):515–23.
131. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: enhanced E-Book. In: 11th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2010. p. 457–9.
132. McLean K, Schirm S, Johns A, Morser J, Light DR. FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834. *Thromb Res.* 2001;103(4):281–97.
133. Bukowska A, Zacharias I, Weinert S, Skopp K, Hartmann C, Huth C, et al. Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. *Eur J Pharmacol.* 2013;718(1–3):114–23.
134. Zuo P, Zuo Z, Wang X, Chen L, Zheng Y, Ma G, et al. Factor Xa induces pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Transl Res.* 2015;7(11):2326–34.

135. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Nishimoto S, et al. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2015 Oct;242(2):639–46.
136. Jobi K, Rauch BH, Dangwal S, Freidel K, Doller A, Eberhardt W, et al. Redox regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(9):1758–64.
137. López-Farré AJ, Rodríguez-Sierra P, Modrego J, Segura A, Martín-Palacios N, Saiz AM, et al. Effects of factor Xa on the expression of proteins in femoral arteries from type 2 diabetic patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(6):1366–77.
138. Moran CS, Seto S-W, Krishna SM, Sharma S, Jose RJ, Biro E, et al. Parenteral administration of factor Xa/IIa inhibitors limits experimental aortic aneurysm and atherosclerosis. *Sci Rep*. 2017 Mar 21;7(1):43079.
139. Ahmad SS, Scandura JM, Walsh PN. Structural and functional characterization of platelet receptor-mediated factor VIII binding. *J Biol Chem*. 2000;275(17):13071–81.
140. Lupu C, Calb M, Ionescu M, Lupu F. Enhanced prothrombin and intrinsic factor X activation on blood platelets from diabetic patients. *Thromb Haemost*. 1993 Oct;70(4):579–83.
141. Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(1):1–16.
142. (EMA) EMA. Xarelto. EPAR. [Internet].
143. Weinz C, Schwarz T, Kubitzka D, Mueck W, Lang D. Metabolism and excretion of rivaroxaban, an oral, direct factor xa inhibitor, in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(5):1056–64.
144. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in

- 
- Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol.* 2018;28(4):R170–85.
145. Jadiya P, Tomar D. Mitochondrial protein quality control mechanisms. *Genes (Basel).* 2020;11(5):6–8.
146. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, De Vries RLA, Kim J, et al. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):378–83.
147. Salazar C, Ruiz-Hincapie P, Ruiz L. The Interplay among PINK1/PARKIN/Dj-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cells.* 2018;7(10):154.
148. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature.* 2006;441(7097):1162–6.
149. Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(38):14503–8.
150. Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene.* 2002 Mar;286(1):81–9.
151. Chang CR, Blackstone C. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 2007;282(30):21583–7.
152. Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins De Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(41):15803–8.
153. Tong M, Zablocki D, Sadoshima J. The role of Drp1 in mitophagy and cell death in the

- heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2020 May;142(1):138–45.
154. Thomas RL, Roberts DJ, Kubli DA, Lee Y, Quinsay MN, Owens JB, et al. Loss of MCL-1 leads to impaired autophagy and rapid development of heart failure. *Genes Dev.* 2013;27(12):1365–77.
155. Yu E, Foote K, Bennett M. Mitochondrial function in thoracic aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2018 Nov 1;114(13):1696–8.
156. Foote K, Reinhold J, Yu EPK, Figg NL, Finigan A, Murphy MP, et al. Restoring mitochondrial DNA copy number preserves mitochondrial function and delays vascular aging in mice. *Aging Cell.* 2018 Aug;17(4):e12773.
157. Summerhill VI, Sukhorukov VN, Eid AH, Nedosugova L V., Sobenin IA, Orekhov AN. Pathophysiological Aspects of the Development of Abdominal Aortic Aneurysm with a Special Focus on Mitochondrial Dysfunction and Genetic Associations. *Biomol Concepts.* 2021;12(1):55–67.
158. Gabrielson M, Vorkapic E, Folkesson M, Welander M, Matussek A, Dimberg J, et al. Altered PPAR $\gamma$  Coactivator-1 Alpha Expression in Abdominal Aortic Aneurysm: Possible Effects on Mitochondrial Biogenesis. *J Vasc Res.* 2016;53(1–2):17–26.
159. Van Der Pluijm I, Burger J, Van Heijningen PM, IJpma A, Van Vliet N, Milanese C, et al. Decreased mitochondrial respiration in aneurysmal aortas of Fibulin-4 mutant mice is linked to PGC1A regulation. *Cardiovasc Res.* 2018;114(13):1776–93.
160. Feng ST, Wang ZZ, Yuan YH, Wang X Le, Sun HM, Chen NH, et al. Dynamin-related protein 1: A protein critical for mitochondrial fission, mitophagy, and neuronal death in Parkinson's disease. *Pharmacol Res.* 2020 Jan;151:104553.
161. Yuan K, Liang W, Zhang J. A comprehensive analysis of differentially expressed genes and pathways in abdominal aortic aneurysm. *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2707–14.

- 
162. Rera M, Bahadorani S, Cho J, Koehler CL, Ulgherait M, Hur JH, et al. Modulation of longevity and tissue homeostasis by the drosophila PGC-1 homolog. *Cell Metab.* 2011;14(5):623–34.
  163. Cooper HA, Cicalese S, Preston KJ, Kawai T, Okuno K, Choi ET, et al. Targeting mitochondrial fission as a potential therapeutic for abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc Res.* 2021;117(3):971–82.
  164. Diot A, Morten K, Poulton J. Mitophagy plays a central role in mitochondrial ageing. *Mamm Genome.* 2016;27(7–8):381–95.
  165. Cavallini G, Donati A, Taddei M, Bergamini E. Evidence for selective mitochondrial autophagy and failure in aging. *Autophagy.* 2007;3(1):26–7.
  166. Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J, Roehrig S, Schlemmer KH, et al. In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939 - An oral, direct Factor Xa inhibitor. *J Thromb Haemost.* 2005;3(3):514–21.
  167. Li Q, Youn JY, Siu KL, Murugesan P, Zhang Y, Cai H. Knockout of dihydrofolate reductase in mice induces hypertension and abdominal aortic aneurysm via mitochondrial dysfunction. *Redox Biol.* 2019 Jun;24:101185.
  168. Miyao M, Cicalese S, Cooper HA, Eguchi S. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial biogenesis are potential therapeutic targets for abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond).* 2019 Oct;133(19):2023–8.
  169. Sinha I, Sinha-Hikim AP, Hannawa KK, Henke PK, Eagleton MJ, Stanley JC, et al. Mitochondrial-dependent apoptosis in experimental rodent abdominal aortic aneurysms. *Surgery.* 2005;138(4):806–11.
  170. Navas-Madroñal M, Rodriguez C, Kassan M, Fité J, Escudero JR, Cañes L, et al. Enhanced endoplasmic reticulum and mitochondrial stress in abdominal aortic

- aneurysm. *Clin Sci (Lond)*. 2019 Jul;133(13):1421–38.
171. Liu Y, Wang TT, Zhang R, Fu WY, Wang X, Wang F, et al. Calorie restriction protects against experimental abdominal aortic aneurysms in mice. *J Exp Med*. 2016;213(11):2473–88.
172. Yan P, Chen K, Wang Q, Yang D, Li D, Yang Y. UCP-2 is involved in angiotensin-II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-knockout mice. *PLoS One*. 2017;12(7):1–13.
173. Sazonova MA, Sinyov V V, Barinova VA, Ryzhkova AI, Zhelankin A V, Postnov AY, et al. Mosaicism of mitochondrial genetic variation in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Biomed Res Int*. 2015;2015:825468.
174. Sobenin IA, Sazonova MA, Postnov AY, Bobryshev Y V, Orekhov AN. Mitochondrial mutations are associated with atherosclerotic lesions in the human aorta. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:832464.
175. Weakley SM, Jiang J, Kougiass P, Lin PH, Yao Q, Brunicardi FC, et al. Role of somatic mutations in vascular disease formation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010 Mar;10(2):173–85.
176. Mukae S, Aoki S, Itoh S, Sato R, Nishio K, Iwata T, et al. Mitochondrial 5178A/C genotype is associated with acute myocardial infarction. *Circ J*. 2003 Jan;67(1):16–20.
177. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen*. 2010 Jun;51(5):440–50.
178. Gao P, Zhang H, Zhang Q, Fang X, Wu H, Wang M, et al. Caloric restriction exacerbates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in the absence of p53. *Hypertension*. 2019;73(3):547–60.
179. Drahotka Z, Milerová M, Stieglerová A, Houštěk J, Ošťádal B. Developmental Changes

- 
- of Cytochrome c Oxidase and Citrate Synthase in Rat Heart Homogenate. *Physiol Res.* 2004;53(1):119–22.
180. Yubero D, Adin A, Montero R, Jou C, Jiménez-Mallebrera C, García-Cazorla A, et al. A statistical algorithm showing coenzyme Q10 and citrate synthase as biomarkers for mitochondrial respiratory chain enzyme activities. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–7.
181. Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, et al. Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation.* 2011 Jul;124(4):444–53.
182. Kang YJ, Bang B-R, Han KH, Hong L, Shim E-J, Ma J, et al. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumours and liver inflammation by mitochondrial PGAM5-Drp1 signalling. *Nat Commun.* 2015 Sep;6:8371.
183. Kim Y-M, Youn S-W, Sudhakar V, Das A, Chandhri R, Cuervo Grajal H, et al. Redox Regulation of Mitochondrial Fission Protein Drp1 by Protein Disulfide Isomerase Limits Endothelial Senescence. *Cell Rep.* 2018 Jun;23(12):3565–78.
184. Hasan P, Saotome M, Ikoma T, Iguchi K, Kawasaki H, Iwashita T, et al. Mitochondrial fission protein, dynamin-related protein 1, contributes to the promotion of hypertensive cardiac hypertrophy and fibrosis in Dahl-salt sensitive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Aug;121:103–6.
185. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Tamaki T. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2001 May;24(3):251–61.
186. Burman JL, Pickles S, Wang C, Sekine S, Vargas JNS, Zhang Z, et al. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J Cell Biol.* 2017;216(10):3231–47.

187. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245–53.
188. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685–98.
189. Sarraf SA, Youle RJ. Parkin mediates mitophagy during beige-to-white fat conversion. *Sci Signal*. 2018;11(527):10–2.
190. Lu X, Altshuler-Keylin S, Wang Q, Chen Y, Henrique Sponton C, Ikeda K, et al. Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism. *Sci Signal*. 2018 Apr 24;11(527):eaap8526.
191. Park H, Chung KM, An HK, Gim JE, Hong J, Woo H, et al. Parkin promotes mitophagic cell death in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Front Mol Neurosci*. 2019 Feb 22;12(46):1–18.
192. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):4078–83.
193. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Apr;21(4):204–24.
194. Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel BA, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol*. 2016 Feb;594(3):509–25.
195. Billia F, Hauck L, Konecny F, Rao V, Shen J, Mak TW. PTEN-inducible kinase 1 (PINK1)/Park6 is indispensable for normal heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jun;108(23):9572–7.
196. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol*. 2017 Apr;18(5):488–98.

- 
197. Gkikas I, Palikaras K, Tavernarakis N. The Role of Mitophagy in Innate Immunity. *Front Immunol.* 2018;9:1283.
  198. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014 Jun;69 Suppl 1:S4-9.
  199. Vorp DA, Geest JP Vande. Biomechanical Determinants of Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Aug;25(8):1558–66.
  200. Koole D, Zandvoort HJA, Schoneveld A, Vink A. Intraluminal abdominal aortic aneurysm thrombus is associated with disruption of wall integrity. *J Vasc Surg.* 2013;57(1):77–83.
  201. Ding Y, Li X, Zhou M, Cai L, Tang H, Xie T, et al. Factor Xa inhibitor rivaroxaban suppresses experimental abdominal aortic aneurysm progression via attenuating aortic inflammation. *Vascul Pharmacol.* 2021 Feb;136:106818.
  202. Vilaseca M, García-Calderó H, Lafoz E, García-Irigoyen O, Avila MA, Reverter JC, et al. The anticoagulant rivaroxaban lowers portal hypertension in cirrhotic rats mainly by deactivating hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2017 Jun;65(6):2031–44.
  203. Imam F, Al-Harbi NO, Khan MR, Qamar W, Alharbi M, Alshamrani AA, et al. Protective Effect of RIVA Against Sunitinib-Induced Cardiotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress-Mediated Inflammation: Probable Role of TGF- $\beta$  and Smad Signaling. *Cardiovasc Toxicol.* 2020 Jun;20(3):281–90.
  204. Narita Y, Hamamura K, Kashiyama M, Utsumi S, Kakizoe Y, Kondo Y, et al. Edoxaban Exerts Antioxidant Effects Through FXa Inhibition and Direct Radical-Scavenging Activity. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug;20(17).
  205. Katoh H, Nozue T, Michishita I. Anti-inflammatory effect of factor-Xa inhibitors in

Japanese patients with atrial fibrillation. *Heart Vessels*. 2017 Sep;32(9):1130–6.

206. Samiei F, Sajjadi H, Jamshidzadeh A, Seydi E, Pourahmad J. Contrasting Role of Concentration in Rivaroxaban Induced Toxicity and Oxidative Stress in Isolated Kidney Mitochondria. *Drug Res (Stuttg)*. 2019 Oct 9;69(10):523–7.



**ANEXOS**



## **XII. ANEXOS**

### **ANEXO 1: PUBLICACIONES.**

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral han sido publicados en la revista *Annals of Vascular Surgery* en el año 2020.

Zamorano-Leon JJ, Serna-Soto M, Moñux G, Freixer G, Zekri-Nechar K, Cabrero-

Fernandez M, Segura A, Gonzalez-Cantalapiedra A, Serrano J, Farré AL.

**Factor Xa Inhibition by Rivaroxaban Modified Mitochondrial-Associated Proteins in Human Abdominal Aortic Aneurysms.**

*Ann Vasc Surg.* 2020 Aug;67:482-489.

doi: 10.1016/j.avsg.2020.02.005. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32173474.

## ANEXO 2: PRESENTACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral han sido presentados en el 65 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascolar celebrado en Gran Canaria el 28 – 31 de mayo de 2019.



65 28 - 31 · MAYO · 2019  
GRAN CANARIA · MASPALOMAS  
CONGRESO SEACV

Maspalomas, 31 de mayo de 2019

El Comité Científico del 65 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascolar 2019,

**CERTIFICA QUE:**

La siguiente comunicación:

**PAPEL DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA PATOGENIA DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL. EFECTO PROTECTOR DEL RIVAROXABAN**  
Maday Cabrero Fernández (1), Guillermo Moñux Ducajú (1), José Javier Zamorano León (2), Mariano De La Serna Soto (3), Antonio José López Farré (3), Francisco Javier Serrano Hernando (1)

1. Hospital clínico San Carlos, Madrid, España; 2. Departamento Salud Pública y Materno-Infantil, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España; 3. Departamento Medicina, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España;

ha sido aceptada y presentada en el Congreso en la sesión "Comunicaciones 1"

  
Valentin Fernández Valenzuela  
Presidente SEACV

  
Joaquín de Haro Miralles  
Comité Organizador Local

  
Julia Ocaña Guaita  
Comité Organizador Local