

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Modificación de mecanismos asociados a la patogénesis y
evolución de aneurismas de aorta abdominal mediante
inhibición del factor Xa con rivaroxabán**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Marqués de Marino

Directores

Francisco Javier Serrano Hernando
Antonio José López Farré

Madrid

© Pablo Marqués de Marino, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIÓN DE MECANISMOS ASOCIADOS A LA PATOGÉNESIS Y
EVOLUCIÓN DE ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL
MEDIANTE INHIBICIÓN DEL FACTOR X_a CON RIVAROXABÁN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

PABLO MARQUÉS DE MARINO

DIRECTOR

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**MODIFICACIÓN DE MECANISMOS ASOCIADOS A LA PATOGÉNESIS Y
EVOLUCIÓN DE ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL
MEDIANTE INHIBICIÓN DEL FACTOR X_a CON RIVAROXABÁN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

PABLO MARQUÉS DE MARINO

DIRECTOR

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores Francisco Javier Serrano Hernando, Antonio José López Farré y Guillermo Moñux Ducajú y financiado por el programa Biomedicina 2017 de la Comunidad de Madrid a través del proyecto GenObIA-CM (Proyecto S2017/BDM-3773), el Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social [Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (RETICs) RD12/0042/0040 y RD12/0042/0011], Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Fondos FEDER) y Bayer Pharmaceuticals.

A mis padres

A Marina, Javi, Lies y Max

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la contribución de un gran número de personas que me aportaron sus conocimientos, experiencias y apoyo. A todas ellas quiero mostrar mi agradecimiento:

En primer lugar, a los directores de esta Tesis Doctoral, que han hecho posible su realización: al Dr. Javier Serrano, que ha sido desde siempre un ejemplo a seguir y al que debo gran parte de lo que soy como cirujano hoy. Al Dr. Guillermo Moñux, que no solo me enseñó a operar, sino que me contagió su interés por la investigación y me animó a empezar este proyecto. Al Dr. Antonio López Farré, que sigue obrando el milagro de convencer a cirujanos de la importancia de la investigación básica y apoyándonos en todo momento en esta preciosa tarea. Al Dr. Fernando Reguillo, por su ayuda como tutor y su inmediata disponibilidad en tiempos difíciles de pandemia.

Al Laboratorio de Innovación Tecnológica y Clínica Aplicada II de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y a Dr. José Javier Zamorano por su inestimable ayuda en el análisis de las muestras y en la realización de este estudio.

Al Servicio de Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos al completo: A todos los adjuntos que han tenido la paciencia de convertirme en cirujano. A mis residentes mayores y pequeños que me han acompañado en este viaje del que he salido con amigos para toda la vida. A Lola, Rosalía, Maribel, Piluca y a todos los enfermeros, auxiliares y celadores de quirófano y de la 7ª planta.

Al Servicio de Cirugía Vascul ar del hospital Klinikum Süd de Núremberg, y en especial al Prof. Eric Verhoeven y al Dr. Thanos Katsargyris, por apoyarme desde el principio y continuar cultivando e impulsando mi interés por la investigación.

A los Dres. Nieves López y Alfredo Corell, que me iniciaron en el mundo de la investigación desde los años de la facultad y todavía hoy siguen ayudándome.

A mis padres. Todo lo que soy se lo debo a su ejemplo, su cariño y su dedicación. A Javi, Lies y Max, por todo su apoyo y por hacerme sentir que están conmigo en todo momento, aún en la distancia. A Paloma, por contagiarme su vocación por la cirugía vascular y guiarme durante toda mi formación y vida profesional. A toda mi familia, por el privilegio de haber crecido rodeado de gente tan excepcional.

A Marina, por hacerme mejor persona cada día y aceptar siempre con una sonrisa los ratos que esta tesis ha robado de nuestro tiempo juntos. A Helmut, Jutta, Tobi y Laura, por acogerme como parte de su familia desde el principio.

A todos los amigos y compañeros que han estado a mi lado estos años y me han dado fuerzas para continuar.

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

AAA: aneurisma de aorta abdominal

AAAr: aneurisma de aorta abdominal roto

AngII: Angiotensina II

APC: Proteína activada C

ApoE^{-/-}: Ratón con deficiencia en apolipoproteína E

ATC: Angiografía por tomografía computarizada

BCA: Ácido biciconínico

BSA: Seroalbúmina bovina

CID: Coagulación intravascular diseminada

DMSO: dimetil sulfóxido

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ensayo de inmonoabsorción ligado a enzimas)

EVAR: Endovascular Aneurysm Repair (Reparación endovascular de aneurismas)

FIIa: Factor IIa

FXa: Factor Xa

HRP: horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IL: Inteleucina

IPC: Inhibidor de la proteína C

MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos

MMP: Metaloproteinasa de la matriz

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

mSv: milisieverts

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida

NO: Óxido nítrico

NOS/NOS2: Oxído nítrico sintasa/2

PAR: protease-activated receptor (receptor activado por proteasas)

PCI: Inhibidor de la proteína C

PET: Tomografía por emisión de positrones

PVDF: polifluoruro de vinilideno

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RL: Radicales libres

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

TIMP: inhibidores tisulares de metaloproteinasas

TC: tomografía computarizada

UA: Unidades arbitrarias

ÍNDICE

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	12
2.1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL	12
2.1.1. Definición.....	12
2.1.2. Epidemiología	13
2.1.3. Factores de riesgo.....	14
2.1.4. Historia natural y morbimortalidad.....	14
2.1.5. Diagnóstico	15
2.1.5.1. Anamnesis y exploración física.....	16
2.1.5.2. Ecografía abdominal	16
2.1.5.3. Tomografía computarizada.....	18
2.1.5.4. Resonancia magnética nuclear	20
2.1.5.5. Tomografía por emisión de positrones.....	21
2.1.6. Cribado e indicación de tratamiento.....	22
2.1.7. Tratamiento	24
2.1.7.1. Tratamiento quirúrgico.....	24
2.1.7.2. Tratamiento médico.....	26
2.1.8. Etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal.....	27
2.1.8.1. Anatomía de la pared arterial sana	27
2.1.8.2. Anatomía de la pared arterial aneurismática	32
2.1.8.3. Mecanismos etiopatogénicos implicados en la formación de AAA.....	34
2.1.8.3.1. Actividad proteolítica en la pared arterial	35
2.1.8.3.2. Cambios en las células parenquimatosas.....	39
2.1.8.3.3. Inflamación y respuesta inmune.....	40
2.1.8.3.4. Estrés oxidativo	42
2.2. HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN.....	44
2.2.1. Hemostasia	45
2.2.1.1. Vasoconstricción refleja.....	45
2.2.1.2. Hemostasia primaria.....	45
2.2.1.3. Hemostasia secundaria	46
2.2.2. Factor Xa y efectos pleiotrópicos del factor Xa	47
2.2.3. Coagulación y aneurismas.....	49

2.3. RIVAROXABÁN	51
2.3.1. Descripción del fármaco, farmacocinética y farmacodinámica.....	51
2.3.2. Indicaciones terapéuticas.....	53
2.4. PROTEÓMICA	54
2.4.1. Aplicación de la proteómica en los AAA.....	56
3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	61
4. OBJETIVOS	66
5. MATERIAL Y MÉTODOS	71
5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AORTA	71
5.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA	72
5.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.....	73
5.3.1. Material empleado.....	75
5.3.2. Preparación de las muestras	77
5.3.2.1. Homogeneización de las muestras	77
5.3.2.2. Cuantificación de proteínas	77
5.3.3. Desnaturalización de proteínas y electroforesis en gel.....	78
5.3.4. Transferencia de proteínas y bloqueo.....	79
5.3.5. Marcaje de las proteínas.....	81
5.3.6. Análisis.....	82
5.4. ANÁLISIS POR ELISA.....	83
5.4.1. Material utilizado	84
5.4.2. Preparación de las muestras y análisis	85
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
6. RESULTADOS	90
6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS	90
6.2. NIVELES DE FXa EN LAS MUESTRAS E INHIBICIÓN POR RIVAROXABÁN	92
6.3. BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN.....	93
6.4. EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE LA NADPH OXIDASA.....	98
6.5. NIVELES DE MMP-9 Y SU ASOCIACIÓN CON PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	101
7. DISCUSIÓN	107
7.1. FXa Y COAGULACIÓN EN AAA.....	107
7.2. BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN MUESTRAS DE AAA HUMANO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LOS MISMOS.....	111

7.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO EN MUESTRAS DE AAA HUMANO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LAS MISMAS	116
7.4. NIVELES DE MMP-9 EN MUESTRAS DE AAA HUMANO, ASOCIACIÓN CON PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LOS MISMOS	121
7.5. COMENTARIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO	124
7.6. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	126
8. CONCLUSIONES	131
9. BIBLIOGRAFÍA	136

1. RESUMEN/ABSTRACT

1. RESUMEN

Modificación de mecanismos asociados a la patogénesis y evolución de aneurismas de aorta abdominal mediante inhibición del Factor Xa con rivaroxabán.

Introducción:

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) sigue siendo una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo occidental, llegando a ser la decimoquinta causa de muerte global. Actualmente no existe ninguna terapia médica efectiva para la prevención y tratamiento de los AAA. Sin embargo, los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad han sido ampliamente estudiados y se conoce el papel fundamental de la actividad proteolítica, la inflamación y el estrés oxidativo en la formación, desarrollo y rotura de los AAA.

El factor Xa (FXa) es uno de los componentes más importantes de la cascada de la coagulación, pero también presenta efectos directos sobre la pared vascular alterando el metabolismo energético y aumentando el estrés oxidativo y la inflamación a dicho nivel. El rivaroxabán, un inhibidor del FXa, ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antiestrés oxidativo en enfermedades que comparten factores etiopatogénicos con los AAA, tales como la aterosclerosis. No obstante, no se ha estudiado aún el efecto de este fármaco en AAA humanos.

Objetivo:

El objetivo de este estudio es analizar *in vitro* si el rivaroxabán puede modificar la expresión de proteínas implicadas en la patogénesis del AAA, tales como

metaloproteinasas (MMP) y marcadores relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en muestras de AAA humano.

Material y Métodos:

Se obtuvieron muestras de tejido aneurismático con trombo mural intraluminal de seis pacientes intervenidos de AAA de forma electiva. Asimismo, se tomaron controles de aorta abdominal sana de seis donantes de órganos. Las muestras de AAA fueron incubadas en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán. Se determinaron los niveles de expresión de subunidades de la NADPH oxidasa citosólica y mitocondrial, de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), el FXa y MMP-9 mediante *Western Blot*. La liberación de IL-6 e IL-10 de los explantes aórticos, así como su contenido en trombina fueron analizados en el sobrenadante mediante ELISA.

Resultados:

Los niveles de IL-6 liberada por el aneurisma (AAA 135,07 vs control 23,45 pg/ml por mg de tejido, $p=0,002$) y los niveles de expresión proteica de NOS2 (AAA 3842 vs control 1060 UA, $p=0,009$) y de las subunidades gp-67 (AAA 8002 vs control 2358,5 UA, $p=0,009$) y gp-91 phox (AAA 3971,5 vs control 1493 UA, $p=0,002$) de la NADPH oxidasa fueron significativamente mayores en las muestras de AAA que en los controles, no así la subunidad gp-47.

La adición de rivaroxabán a las muestras de AAA redujo la liberación de IL-6 (rivaroxabán 51,61 vs AAA 135,07 pg/ml por mg de tejido, $p=0,028$) y la expresión de NOS2 (rivaroxabán 2140,5 vs AAA 3842 UA, $p=0,075$) y de las subunidades gp-67 (rivaroxabán 2296,5 vs AAA 8002 UA, $p=0,028$) y gp-91 phox (rivaroxabán 2022,5 vs AAA 3971,5 UA, $p=0,028$) de la NADPH oxidasa hasta niveles similares a los de los controles de aorta sana.

Las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán también presentaron un marcado incremento de liberación de IL-10 que fue significativamente mayor que en los controles (rivaroxabán 116,87 vs control 18,29 pg/ml por mg de tejido, $p=0,002$) y que en las muestras de AAA incubadas sin rivaroxabán (rivaroxabán 116,87 vs AAA 19,91 pg/ml por mg de tejido, $p=0,028$). Por ello, la ratio proinflamatoria IL-6/IL-10 se redujo en las muestras con rivaroxabán en comparación con las muestras incubadas sin el fármaco (rivaroxabán 0,52 vs AAA 7,2, $p=0,028$) e incluso respecto a los controles (rivaroxabán 0,52 vs control 1,51, $p=0,015$)

El contenido de MMP-9 fue también significativamente mayor en las muestras de AAA que en los controles (AAA 6487,5 vs control 2581 UA, $p=0,002$) y sus niveles de expresión se relacionaron directamente con los niveles de NOS2 ($p=0,005$), subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa ($p=0,003$), IL-6 ($p<0,001$) y con la ratio IL-6/IL-10 ($p=0,005$). El rivaroxabán redujo significativamente la expresión de MMP-9 en los AAA respecto a las muestras sin fármaco (rivaroxabán 3278 vs AAA 6487,5 UA, $p=0,043$) hasta niveles similares a los encontrados en las aortas de control (rivaroxabán 3278 vs control 2581 UA, $p=0,662$).

Conclusiones:

El rivaroxabán ha demostrado ser capaz de reducir *in vitro* la expresión de proteínas implicadas en la patogénesis del AAA tales como metaloproteinasas y marcadores relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo, así como promover un estado antioxidativo en muestras de AAA humano. Estos hallazgos sugieren la participación del FXa en estos mecanismos etiopatogénicos. Profundizar en el conocimiento de los posibles efectos del FXa en AAA puede abrir nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento mediante inhibición del mismo.

ABSTRACT

Changes in the mechanisms associated with the pathogenesis and evolution of abdominal aortic aneurysms through Factor Xa inhibition by rivaroxaban.

Introduction:

Abdominal aortic aneurysms (AAA) remain one of the leading mortality causes in western countries, being the fifteenth most common cause of death globally. No effective medical therapy is currently available for the prevention and treatment of AAA. However, the etiopathogenesis of this disease has been thoroughly studied and it is well known the key role of proteolytic activity, inflammation and oxidative stress in the development, growth and rupture of AAAs.

Factor Xa (FXa) is one of the most important components of the coagulation cascade, but it also has a direct effect on the vascular wall, modifying the energetic metabolism and increasing the oxidative stress and inflammation at that level.

Rivaroxaban, a FXa inhibitor, has proved to have anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in diseases that share pathogenic mechanisms with AAAs, such as atherosclerosis. However, the effect of this drug in human AAAs has not been assessed yet.

Objective:

The aim was to analyze in vitro if rivaroxaban modifies the expression of proteins implicated in the etiopathogenesis of AAA, such as metalloproteinases and markers related to inflammation and oxidative stress in human AAA samples.

Materials and Methods:

Aneurysmal sites with intraluminal thrombus were obtained from six patients undergoing elective AAA surgical repair. Control samples of healthy aorta were collected from six organ donors. Each AAA explant was incubated in the presence and in the absence of 50 nmol/L of rivaroxaban.

Western blot analysis was carried out to assess the expression level of cytosolic and mitochondrial NADPH oxidase subunits, nitric oxide synthase 2 (NOS2), FXa and MMP-9. Release of IL-6 and IL-10 in the aortic explants, as well as the thrombin content were determined in the supernatants of the aortic samples using ELISA kits.

Results:

IL-6 levels released by the aneurysm (AAA 135,07 vs control 23,45 pg/ml per mg tissue, $p=0,002$) and expression level of NOS2 (AAA 3842 vs control 1060 AU, $p=0,009$), gp-67 phox (AAA 8002 vs control 2358,5 AU, $p=0,009$) and gp-91 phox (AAA 3971,5 vs control 1493 AU, $p=0,002$) NADPH oxidase subunits were found significantly increased in the AAA samples compared to the controls, not so gp-47 phox.

Rivaroxaban incubation of AAA sites significantly reduced IL-6 release (rivaroxaban 51,61 vs AAA 135,07 pg/ml per mg tissue, $p=0,028$) and expression of NOS2 (rivaroxaban 2140,5 vs AAA 3842 AU, $p=0,075$), gp-67 phox (rivaroxaban 2296,5 vs AAA 8002 AU, $p=0,028$) and gp-91 phox (rivaroxaban 2022,5 vs AAA 3971,5 AU, $p=0,028$) NADPH oxidase subunits from AAA sites, reaching levels similar to those of the healthy aorta controls.

Rivaroxaban-incubated AAA samples also showed a marked increase in IL-10 release, which was significantly higher than in controls (rivaroxaban 116,87 vs control 18,29 pg/ml per mg tissue, $p=0,002$) and in AAA samples incubated without rivaroxaban (rivaroxaban 116,87 vs AAA 19,91 pg/ml per mg tissue, $p=0,028$).

For this reason, pro-inflammatory index IL-6/IL-10 decreased in the samples with rivaroxaban in comparison with those incubated without the drug (rivaroxaban 0,52 vs AAA 7,2, $p=0,028$) and even with controls (rivaroxaban 0,52 vs control 1,51, $p=0,015$). MMP-9 content was also significantly higher in AAA samples than in controls (AAA 6487,5 vs control 2581 AU, $p=0,002$) and its expression levels directly correlated with the levels of NOS2 ($p=0,005$), gp91-phox subunit ($p=0,003$), IL-6 ($p<0,001$) and with IL-6/IL-10 index ($p=0,005$). Rivaroxaban significantly reduced the expression of MMP-9 in AAA in relation to samples without the drug (rivaroxaban 3278 vs AAA 6487,5 AU, $p=0,043$), reaching similar levels as those found in control aortas (rivaroxaban 3278 vs control 2581 AU, $p=0,662$).

Conclusions:

Rivaroxaban was able to reduce in vitro the expression of proteins involved in the pathogenesis of AAA such as metalloproteinases and proteins related to inflammation and oxidative stress, as well as to promote an anti-oxidant state in human AAA sites. These findings suggest an involvement of FXa in such mechanisms. A deeper understanding of the possible effects of FXa in AAA may open new clinical targets for the medical treatment of AAA by FXa inhibition.

2. INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL

2.1.1. Definición

La palabra aneurisma, proviene de la palabra ἀνεύρυσμα, que en griego antiguo significa dilatación o ensanchamiento. Los aneurismas arteriales son una dilatación focal y permanente de una arteria en cualquier parte del cuerpo que alcance un diámetro máximo al menos un 50% mayor que el esperado para ese vaso a dicho nivel (1). La aorta abdominal es la localización más prevalente de esta patología y este trabajo se centra en el estudio de este tipo de aneurismas arteriales.



Figura 2.1: Reconstrucción 3D de un aneurisma de aorta abdominal.

Por consenso, se suele definir el aneurisma de aorta abdominal (AAA) como la dilatación de la aorta infrarrenal que supere los 3 centímetros de diámetro, lo que se corresponde con más de dos desviaciones estándar del diámetro medio de la aorta a este nivel en

varones (2). Sin embargo, este umbral puede ser demasiado alto en mujeres y en pacientes asiáticos (3, 4), por lo que se considera que un diámetro superior a 1,5 veces el diámetro de la aorta suprarrenal o el diámetro esperado a nivel infrarrenal es una definición más precisa al compensar las variaciones poblacionales (5).

2.1.2. Epidemiología

La prevalencia del AAA antes de los 55-60 años es insignificante y a partir de dicha edad, aumenta de forma constante con el tiempo (6). Los estudios de cribado poblacional aportan el mayor nivel de evidencia sobre la prevalencia de esta patología, que actualmente se encuentra entre el 0,5 y el 3,3% en varones mayores de 65 años en Europa occidental, según los resultados de los programas de cribado de Suecia (7), Gran Bretaña (8) y Dinamarca (9) y del 5,1% en fumadores según un estudio de cribado en Estados Unidos (10). Estos estudios poblacionales también indican que la prevalencia de AAA es mayor en Australia, Norte América y Europa Occidental respecto a Latinoamérica y Asia central (6) y que la prevalencia en mujeres es cuatro veces inferior a la de los hombres, siendo esta del 0,7% en mujeres mayores de 60 años (11).

Sin embargo, durante los últimos 20 años la prevalencia y la incidencia de esta patología ha ido disminuyendo tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo, debido probablemente al descenso en el consumo de tabaco durante este periodo (7, 12). Este descenso ha llevado asociado también una disminución en la incidencia de rotura de AAA de entre el 20 y el 50% en los últimos 20-30 años en Europa y Estados Unidos, a pesar del envejecimiento de la población en estos lugares (13-16).

2.1.3. Factores de riesgo

Se conocen distintos factores de riesgo asociados al AAA tales como: edad avanzada, raza caucásica, historia familiar de AAA, sexo masculino, tabaco, hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedad arterial periférica y enfermedad coronaria (17). Sin embargo, la diabetes (especialmente la tipo II) es un factor protector frente a AAA disminuyendo el riesgo a la mitad (18, 19). Estudios con gemelos univitelinos han demostrado que la heredabilidad del riesgo frente a AAA puede ser hasta del 70% (20).

De todos estos, el tabaquismo es el factor de riesgo más importante, asociándose al AAA con una *odds ratio* >3 (7, 21), presentando una correlación aún mayor en mujeres (22, 23) y aumentando progresivamente en función de los años de consumo de tabaco.

2.1.4. Historia natural y morbimortalidad

En la mayoría de pacientes, la historia natural del AAA es el crecimiento progresivo del mismo hasta la rotura. Este crecimiento es similar en hombres y mujeres con AAA entre 3 y 5,5 cm de diámetro, situándose en torno a 2,2 mm/año de media (24). Los factores de riesgo y protectores para la aparición de un AAA también se asocian a su crecimiento, aumentando este de media 0,35 mm/año (16%) en paciente fumadores y disminuyendo de media 0,51 mm/año (25%) en pacientes diabéticos (24). La tasa de crecimiento aumenta también con el diámetro máximo del aneurisma, siendo de media de 1,3 mm/año en AAA de 3 cm y de 3,6 mm/año en AAA de 5 cm (24). Estas tasas se han mantenido estables en las últimas décadas (25).

La influencia del tratamiento farmacológico en el crecimiento de AAA se discutirá de forma independiente en un apartado posterior.

Aunque se ha descrito morbilidad asociada a los AAA en relación a inflamación, embolización, trombosis, disección e infección del mismo, la incidencia de estas complicaciones es despreciable y la morbimortalidad derivada de esta patología se debe principalmente al riesgo de rotura del mismo. A pesar de los avances en el tratamiento emergente, el AAA roto (AAAr) mantiene una mortalidad global del 75-80% debido a que tres cuartas partes de estos pacientes fallecen antes de llegar a quirófano (26) y que la mortalidad entre los que reciben tratamiento alcanza el 50% con un 15% de muertes intraoperatorias (27).

De este modo, el AAAr sigue siendo una de las causas más importantes de mortalidad en el mundo occidental, llegando a ser la decimoquinta causa de muerte global y la décima en varones mayores de 55 años en Estados Unidos, con una incidencia de 11,3 muertes por 100000 habitantes en varones blancos mayores de 55 (28).

Por ello, el diagnóstico precoz, la prevención del crecimiento y rotura y el tratamiento previo a la misma resultan esenciales para disminuir el impacto de esta patología en nuestros pacientes.

2.1.5. Diagnóstico

La mayoría de AAA intactos cursan de manera asintomática, por lo que el diagnóstico suele ser casual. Los casos sintomáticos suelen cursar con dolor espontáneo o a la palpación, localizado en la región del aneurisma o irradiado hacia la zona lumbar o

genital. Raramente pueden aparecer síntomas por compresión, como náuseas, vómitos o sensación de saciedad al comprimirse el duodeno, síntomas urinarios e hidronefrosis por afectación ureteral y síntomas venosos como edema de miembros inferiores o trombosis venosa profunda por compresión iliocava. Más infrecuentemente puede aparecer dolor óseo por erosión de vertebras adyacentes o síntomas derivados de complicaciones isquémicas por embolización distal.

El AAAr, en cambio, suele tener un curso dramático con clínica repentina de palidez, colapso circulatorio, dolor intenso a nivel abdominal o lumbar, distensión abdominal e incluso síntomas derivados de una fistula aortoentérica o arterio-venosa primaria.

2.1.5.1. Anamnesis y exploración física

La anamnesis detallada puede darnos información sobre los factores de riesgo para AAA ya enumerados y la exploración física puede revelar una masa pulsátil en el mesogastrio del paciente. Sin embargo, la sensibilidad de la palpación abdominal para el diagnóstico de AAA es inferior al 50% (29) y aún menor en pacientes obesos con perímetro abdominal superior a los 100 cm (30), por lo que el examen físico no resulta una prueba fiable para descartar la presencia de un AAA.

2.1.5.2. Ecografía abdominal

La ecografía abdominal es la prueba de elección para detección y seguimiento de AAA de pequeño diámetro, presentando una sensibilidad y especificidad próximas al 100% (31). Esta exploración, sin embargo, presenta limitaciones debido a la variación de diámetro con el ciclo cardíaco y a las dificultades de la exploración en pacientes obesos

o con abundante gas intestinal y no permite visualizar correctamente la aorta suprarrenal y torácica. Además, presenta una importante variabilidad intraobservador e interobservador (32), considerándose aceptable la precisión de la exploración si se consigue una diferencia media entre distintas mediciones inferior a 5 mm en el 95% de los casos (33). Por otro lado, no resulta fiable para diagnosticar una rotura aórtica (34) ni planificar un tratamiento endovascular del AAA y tiende a infraestimar el diámetro del aneurisma respecto a la tomografía computarizada (TC) en torno a 2 mm (35), llegando a medir más de 55 mm en la TC un 70% de los aneurismas clasificados como 50-55 mm mediante ecografía (36).

Por ello, se recomienda mantener el seguimiento con ecografía solo en AAA de pequeño calibre, pasando a la TC cuando el diámetro se acerque al límite de indicación quirúrgica.

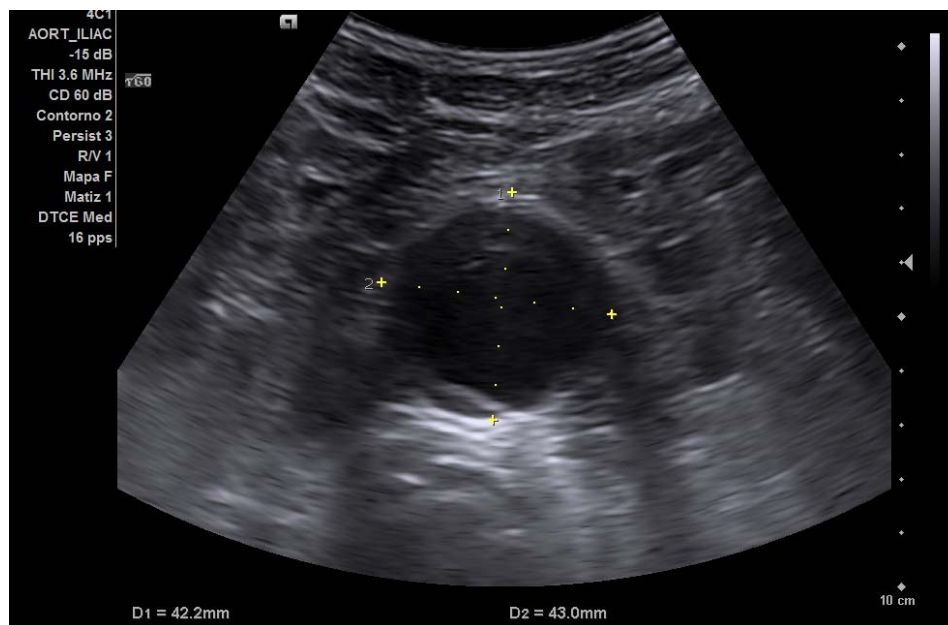


Figura 2.2: Imagen ecográfica axial de un aneurisma de aorta abdominal.

2.1.5.3. Tomografía computarizada

La TC con contraste yodado o angiografía por tomografía computarizada (ATC) es la prueba de elección para analizar la extensión de la patología aneurismática, marcar la indicación de tratamiento, planificar dicho tratamiento y diagnosticar una rotura del aneurisma, siendo también útil en el seguimiento tras la reparación del AAA.

La ATC comparte algunos de los problemas de la ecografía abdominal en cuanto a la variación de diámetro con el ciclo cardíaco y las diferencias en las mediciones axiales respecto a las ortogonales en aortas anguladas. Mantiene una variabilidad intraobservador inferior a 5 mm según los criterios previamente indicados (37) y, aunque algunos estudios indican que la variabilidad interobservador puede ser alta, influyendo en la selección de pacientes con indicación para tratamiento (38), el uso de magnificación, reconstrucciones multiplanares y software de medición semiautomático disminuyen estas diferencias (37).

La ATC presenta numerosas ventajas respecto a la ecografía abdominal para la planificación del tratamiento: aporta información sobre la aorta completa (incluyendo su porción torácica), sus ramas arteriales y las estructuras adyacentes, permite reconstrucciones perpendiculares y tridimensionales y mediciones precisas de diámetros y longitudes para la planificación de un tratamiento endovascular y, más recientemente, puede servir como ayuda intraoperatoria mediante técnicas de fusión de ATC y angiografía que disminuyen el tiempo quirúrgico, la radiación y el contraste utilizado (39, 40).

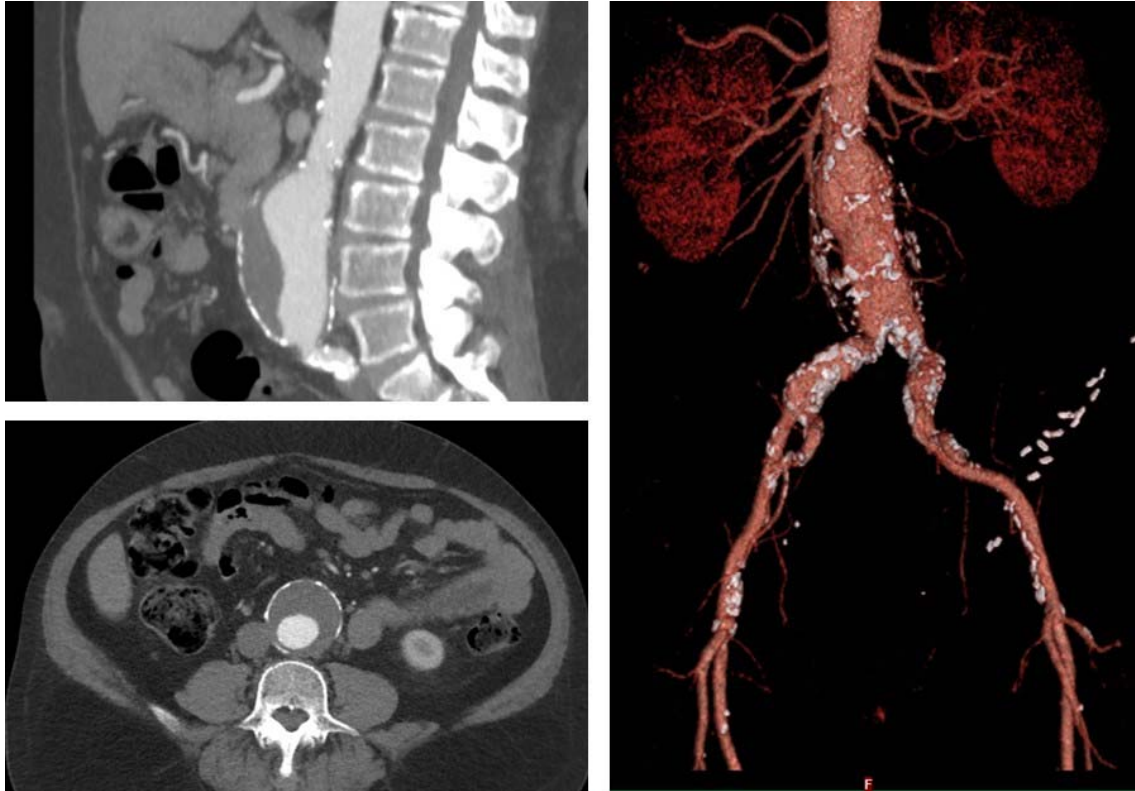


Figura 2.3: Imagen sagital (arriba), axial (abajo) y reconstrucción 3D (derecha) de una tomografía computarizada con contraste yodado de un AAA.

El aumento del uso de la ATC para diagnóstico y seguimiento de AAA ha puesto de relieve los dos riesgos más importantes relacionados con esta: la utilización de contraste yodado nefrotóxico y la radiación recibida por el paciente. Por ello es importante evaluar la función renal antes de la realización de una ATC así como asegurar una hidratación adecuada, oral o intravenosa, para evitar episodios de nefropatía por contraste (41).

Por otro lado, la radiación acumulada por las ATC repetidas pueden conllevar un riesgo aumentado de cáncer. La dosis acumulada media por paciente y año es de 104 mSv, lo que conlleva un riesgo medio de 0.8% de muerte inducida por exposición a dicha radiación ionizante (42) y aún mayor en pacientes jóvenes (43). El seguimiento pre y

postoperatorio mediante ecografía, las técnicas de fusión Angiografía-ATC y otras medidas de optimización de la dosis recibida resultan por tanto esenciales para disminuir el riesgo de sufrir dichas complicaciones en pacientes con tratamiento endovascular de AAA.

2.1.5.4. Resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) presenta algunas ventajas sobre la ATC como la ausencia de radiación ionizante y de contraste yodado y la excelente diferenciación de partes blandas circundantes. Además, al añadir contraste intravenoso con gadolinio, permite estudios dinámicos en el tiempo, analizando los movimientos de la pared vascular y el flujo sanguíneo. Sin embargo, la disponibilidad es más limitada que en la ATC, presenta contraindicaciones en pacientes con claustrofobia o implantes metálicos, la adquisición de imágenes es más lenta, presenta una menor resolución espacial y existen pocos datos acerca de la fiabilidad de la RMN respecto a la ATC para medición de aneurismas y seguimiento postoperatorio (44).

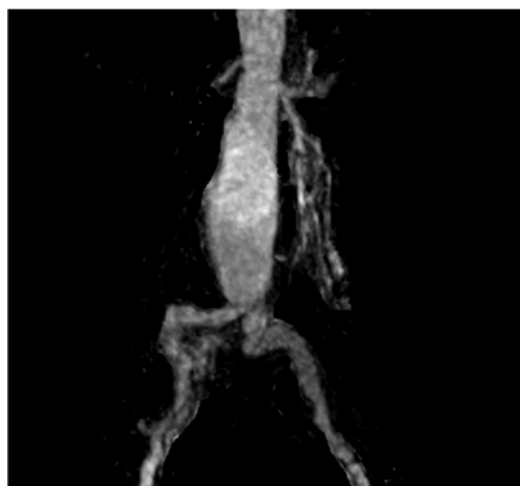


Figura 2.4: Imagen por resonancia magnética nuclear de un AAA.

2.1.5.5. Tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones (PET) cuantifica la actividad metabólica de las células mediante la detección de la distribución en el cuerpo de un radiofármaco (fluorodesoxiglucosa). Al poder cuantificar también esta actividad en células inflamatorias, puede resultar de utilidad en el diagnóstico y seguimiento de aneurismas inflamatorios (45), aneurismas micóticos (46), e infecciones de prótesis o endoprótesis (47). Sin embargo, excluyendo estas indicaciones, su uso en el campo de los aneurismas está actualmente restringido a la investigación.

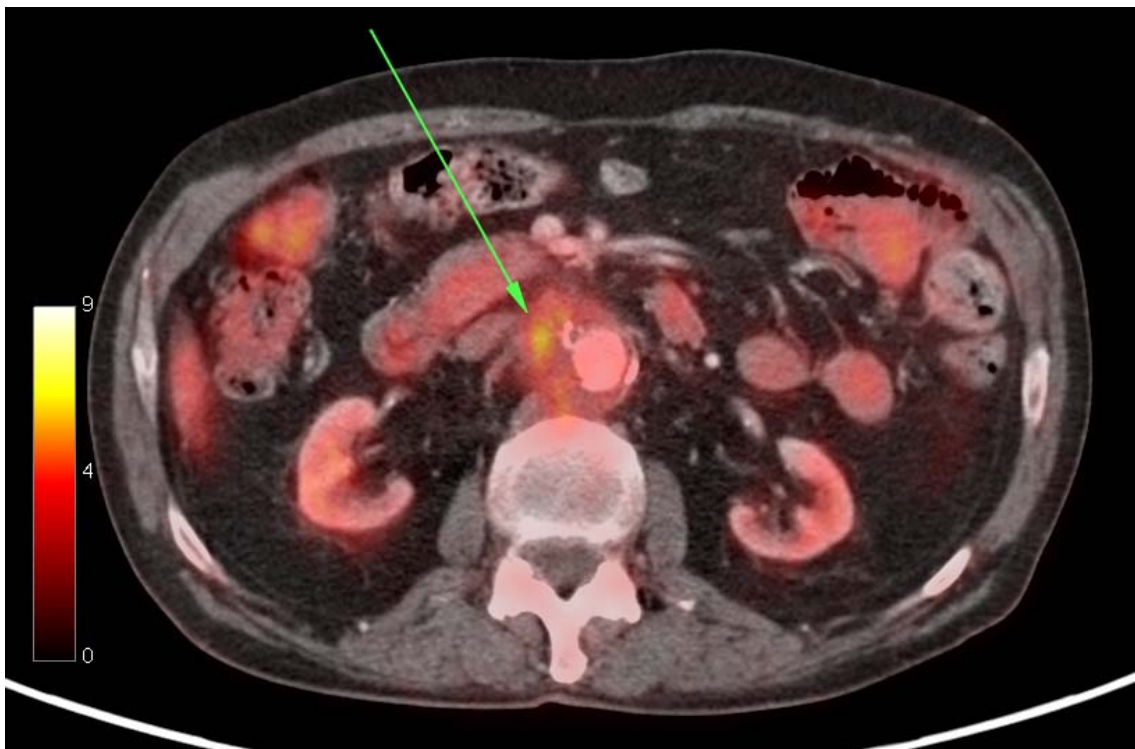


Figura 2.5: Imagen de un AAA mediante tomografía por emisión de positrones.

2.1.6. Cribado e indicación de tratamiento

Dada la citada escasez de síntomas de esta patología y la sensibilidad y especificidad del diagnóstico mediante una prueba no invasiva como el ecodoppler abdominal, el cribado poblacional de AAA se ha planteado como una opción para disminuir la morbimortalidad asociada a los mismos. La evidencia a favor de esta medida se basa en cuatro ensayos clínicos aleatorizados realizados en hombres (48-51) y uno en mujeres (52) caucásicos mayores de 65 años. Esta evidencia se recoge en una revisión sistemática realizada por Cosford *et al.* (53) en la que se concluye que el cribado de AAA en varones mayores de 65 años disminuye la mortalidad relacionada con el aneurisma, con una *odds ratio* de 0,6 (IC95% 0,47-0,78). Estos resultados se han confirmado más recientemente en un estudio poblacional sueco incluyendo cribado en varones mayores de 65 años de todo el país (54).

El descenso en mortalidad en estos estudios se explica por la disminución drástica en el número de cirugías urgentes por aneurisma roto. A pesar de que la frecuencia de reparación electiva de AAA fue del doble en los pacientes que acudieron al cribado (y por tanto, aumentaron también las complicaciones asociadas a dichas intervenciones en estos pacientes), la enorme diferencia en morbimortalidad entre la reparación electiva de un AAA intacto y la reparación urgente de un AAAr compensa este aumento. De este modo, el número necesario a cribar para prevenir una muerte prematura relacionada con el AAA es 667 pacientes, mientras que el número necesario a tratar de forma electiva es únicamente 1,5 pacientes (54).

Por otro lado, la detección de un AAA conlleva siempre una evaluación del riesgo cardiovascular y consejos en cuanto a disminución del consumo de tabaco, control de la

presión arterial y otros cambios en el estilo de vida, y tratamiento preventivo en estos pacientes, que podrían tener un efecto beneficioso a largo plazo.

Actualmente la indicación de tratamiento de AAA se basa en el diámetro máximo del mismo. Esta decisión tiene en cuenta el riesgo de rotura del AAA que, como se ha indicado, tiene una mortalidad alrededor del 80% y la mortalidad asociada a la reparación electiva del AAA intacto. Por ello, se consideran subsidiarios de tratamiento quirúrgico electivo aquellos aneurismas con un diámetro máximo superior a 5,5 cm. Este límite se basa en los resultados de cuatro ensayos clínicos aleatorizados que han sido recogidos en una revisión sistemática (55) en la que se concluyó que el manejo conservador y seguimiento en aneurismas con un diámetro inferior a 5,5 cm era seguro y coste-efectivo. Asimismo, se considera indicado el tratamiento en pacientes con aneurismas sintomáticos (56) y en aquellos con un crecimiento anual mayor a 1 cm, aunque la evidencia para defender este último criterio sigue siendo baja y dicho crecimiento agudo puede no relacionarse con el crecimiento a largo plazo del AAA o deberse a fallos en la medición (57, 58).

A pesar de presentar una menor incidencia en mujeres, el riesgo de rotura de un AAA en estas pacientes es de tres a cuatro veces superior al de los hombres (24, 59), presentando un riesgo de rotura en aneurismas de 4,5 cm similar al riesgo en pacientes varones con AAA de 5,5 cm (60). Sin embargo, la morbimortalidad asociada a la reparación electiva de AAA en mujeres también es superior a la de los hombres (61), por lo que se ha consensuado que en mujeres resulta prudente el tratamiento electivo de AAA con un diámetro superior a 5 cm (2).

2.1.7. Tratamiento

2.1.7.1. Tratamiento quirúrgico

A pesar de los esfuerzos por encontrar una terapia médica eficaz para evitar el crecimiento y rotura de AAA, actualmente el tratamiento quirúrgico constituye la única alternativa terapéutica efectiva para esta patología.

Existen dos opciones quirúrgicas para el tratamiento de AAA: la cirugía abierta convencional mediante clampaje aórtico, resección del saco aneurismático e implantación de un injerto protésico a dicho nivel y el tratamiento endovascular o EVAR en sus siglas en inglés (Endovascular Aneurysm Repair) en el que se introduce de forma endoluminal una endoprótesis con anclaje proximal y distal al aneurisma, excluyéndolo de la circulación y promoviendo la trombosis del saco aneurismático.

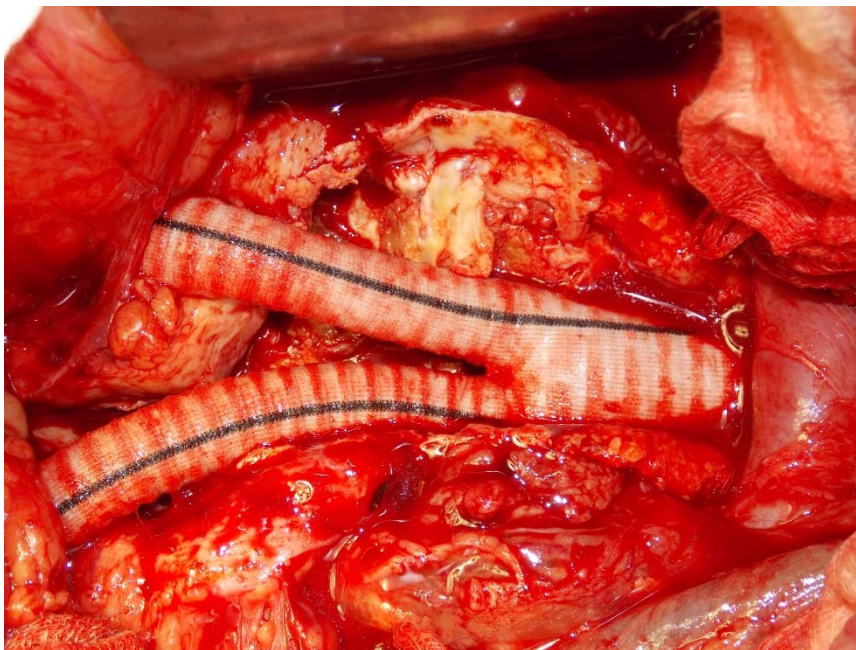


Figura 2.6: Tratamiento quirúrgico convencional mediante resección del aneurisma e implantación de injerto protésico.

Desde la descripción del tratamiento endovascular en 1986 por Volodos (62) y posteriormente en 1991 por Parodi (63), esta opción se ha convertido en la alternativa terapéutica más común para el tratamiento electivo de AAA, siendo la opción utilizada en casi tres cuartas partes de los pacientes en la actualidad (64).

El tratamiento endovascular ha demostrado una menor morbimortalidad perioperatoria con disminución del tiempo quirúrgico y la estancia hospitalaria (65). Sin embargo, los requerimientos anatómicos para estos procedimientos, las dudas sobre la durabilidad de los mismos, la necesidad de seguimiento continuado y el aumento de intervenciones secundarias respecto a la cirugía abierta convencional, hacen que el tratamiento de elección siga siendo objeto de debate y la decisión terapéutica se lleve a cabo de forma individualizada para cada paciente.



Figura 2.7: Reconstrucción tridimensional de un AAA antes y después del tratamiento endovascular.

2.1.7.2. Tratamiento médico

La alta mortalidad asociada al AAAr y el problema clínico que supone el diagnóstico y tratamiento precoz de una patología que cursa, en la mayor parte de los pacientes, de manera asintomática ha impulsado numerosos estudios destinados a encontrar un tratamiento médico que disminuya la formación, crecimiento y rotura de los AAA.

Se han realizado numerosos ensayos clínicos aleatorizados con este objetivo estudiando diferentes fármacos incluyendo doxiciclina, betabloqueantes, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y estatinas (66-68). Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos ensayos ha conseguido encontrar un tratamiento efectivo (69). Tampoco cambios en el estilo de vida tales como el ejercicio físico han demostrado influir en la tasa de crecimiento y rotura de los AAA (70), siendo el abandono del hábito tabáquico el único factor de riesgo modificable con influencia en la evolución de esta patología, disminuyendo en un 20% la tasa de crecimiento y rotura de los mismos (24).

Como ya se ha indicado, los pacientes diabéticos presentan una menor tasa de crecimiento y rotura de AAA, lo que ha llevado a estudiar de forma intensiva en los últimos años la influencia de los antidiabéticos orales, en especial la metformina, en este hecho (71). A pesar de que algunos estudios observacionales señalan un posible efecto protector de la metformina en estos pacientes (72-76), otros no han encontrado asociación con los resultados clínicos (24, 77) ni con los mecanismos fisiopatológicos (78) y han sugerido que esta diferencia se debe a factores de confusión en estas poblaciones.

Aunque actualmente la metformina es el fármaco más prometedor en cuanto a la terapia médica de los AAA, hasta que se publiquen resultados de los ensayos clínicos con esta

molécula que ya están en marcha, no dispondremos de datos fiables sobre la influencia de la misma en esta patología.

Esta falta de terapia médica para la prevención y tratamiento de los AAA es la que motivó el presente trabajo. Las posibilidades de encontrar un fármaco eficaz en esta enfermedad pasan por entender su etiopatogenia para poder contrarrestar sus causas.

2.1.8. Etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal

A pesar de que los AAA siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad (79), su patogenia sigue sin ser del todo conocida. Se sabe que el resultado de los mecanismos en su formación es un debilitamiento progresivo de los elementos estructurales de la pared arterial en todos sus planos, que afecta a las tres capas del vaso (íntima, media y adventicia) y produce la dilatación gradual y permanente de la arteria.

La determinación de estas causas de debilitamiento de la pared resulta crucial para la búsqueda de dianas terapéuticas que puedan frenar o detener este proceso, evitando el crecimiento y rotura del aneurisma.

2.1.8.1. Anatomía de la pared arterial sana

A pesar de que la patología aneurismática presente una mayor incidencia en ciertas localizaciones, la estructura básica de la pared arterial es similar en todo el árbol vascular, modificándose únicamente la proporción de sus elementos en sus distintas regiones anatómicas. De este modo, la pared arterial está compuesta por una matriz de fibras y diferentes células que se organizan en un tejido conectivo dispuesto en tres capas: capa íntima, media y adventicia.

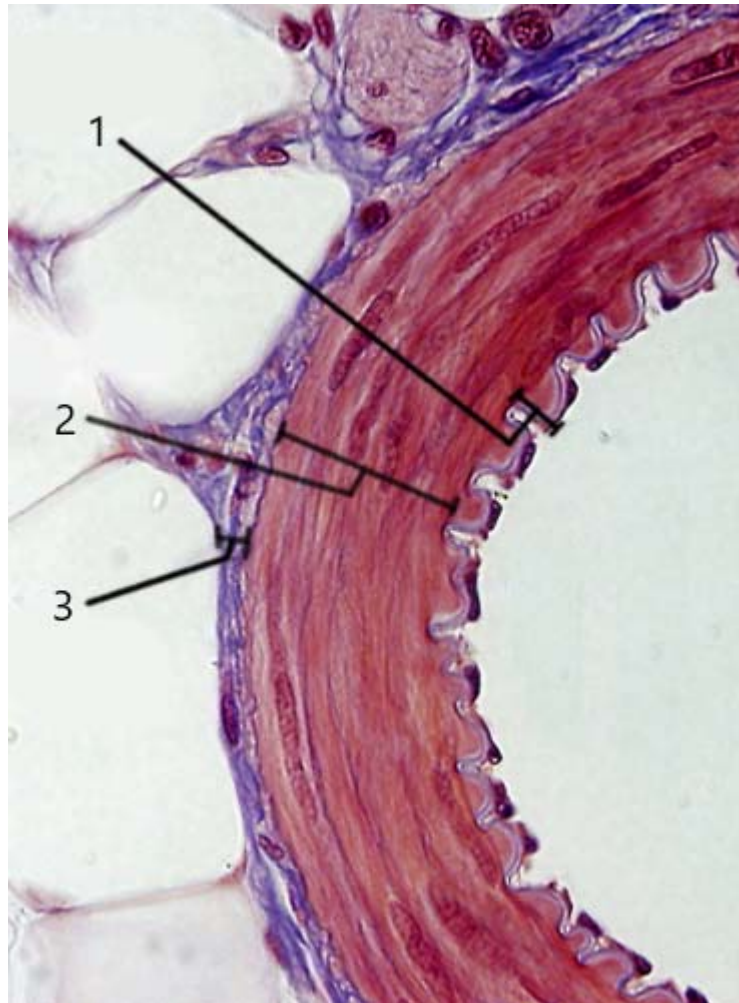


Figura 2.8: Corte histológico de una arteria mostrando la capa íntima (1), media (2) y adventicia (3). *Fuente: Atlas de histología. Universidad Estadual do Sudoeste da Bahia.*

- **Capa íntima:** Localizada en la porción más interna de la pared arterial, la capa íntima está formada por leucocitos, músculo liso y fibras de tejido conectivo. La matriz de esta capa se compone fundamentalmente de fibras elásticas, colágeno y proteoglicanos. Esta capa se encuentra localizada entre la luz del vaso sanguíneo y la capa media y a su vez se subdivide en tres porciones: Endotelio, lámina basal y lámina elástica interna.

- Endotelio: Constituye la porción más interna de la capa íntima, directamente en contacto con la sangre. Está formada por una fina lámina de células endoteliales planas y participa en procesos fisiológicos y patológicos, reaccionando a estímulos físicos, químicos e inmunológicos (80). El endotelio interacciona así con los componentes celulares y acelulares de su medio, siendo un importante regulador del tono vasomotor, el equilibrio hemostático, la permeabilidad y migración celular, y la inmunidad (81).

Su componente intraluminal se encuentra recubierto por el glicocáliz, que le aporta a la superficie endotelial sus propiedades antitrombóticas (82). Éste reduce el rozamiento con el flujo sanguíneo e impide la pérdida de fluidos a través de la pared arterial. La rotura del mismo en procesos inflamatorios, facilita la adhesión de leucocitos en la zona dañada y el inicio del proceso aterosclerótico (83).

Resulta también importante el tipo de unión entre las células del endotelio, existiendo zonas con una unión hermética entre las mismas (*zona occludens*) que se opone al transporte entre las células y mantiene la polaridad de dicha capa y otras zonas con uniones adherentes (*zona adherens*) que permiten el intercambio de iones, metabolitos y factores de regulación (82).

Por último, estas células intervienen también en el balance pro/antitrombótico, dificultando la agregación plaquetaria mediante su actividad ADPasa, la liberación de Óxido Nítrico (NO) y la producción de prostaglandinas.

- Lámina basal: Esta capa rodea al endotelio y proporciona soporte al mismo, participando en la regeneración celular y unión de la capa endotelial. Al igual que la *zona occludens* del endotelio, supone una barrera para la migración celular y además participa en el inicio de la cascada de la coagulación (84). Esta porción especializada de la matriz extracelular, conecta el endotelio con las células del músculo liso y las capas adyacentes (85).

La lámina basal se divide a su vez en dos zonas, una región interna clara (lámina rara) compuesta por laminina y una región fibrilar densa (lámina densa) compuesta por células de colágeno tipo IV. En su conjunto, esta capa proporciona una unión flexible a las células endoteliales que les permite adaptarse a los cambios que las distintas fases del ciclo cardíaco y los movimientos de torsión y flexión producen en ellas, fortaleciendo mecánicamente la pared vascular.

- Lámina elástica interna: Consiste en una lámina de fibras elásticas que separan la capa íntima subendotelial de la capa media. Presenta fenestraciones que permiten el paso por difusión a través de la pared vascular y evita la acumulación de macromoléculas a dicho nivel en las arterias de gran calibre. De esta forma, lesiones en la lámina elástica interna se han relacionado con hiperplasia intimal arterial (86) y formación de placas ateroscleróticas, al favorecer la entrada de macromoléculas, lípidos y leucocitos en la pared (87).
- Capa media: Se encuentra localizada entre la lámina elástica interna y la adventicia y, bajo condiciones fisiológicas de presión arterial, es la principal

responsable de las propiedades mecánicas de la pared arterial aportándole estabilidad a la misma, por lo que está íntimamente relacionada con la formación de aneurismas. Esta capa está compuesta de fascículos orientados de células musculares lisas dentro de una red de fibras elásticas y fibras de colágeno, así como otros elementos como laminina, heparansulfato, entactina o fibronectinas que conforman su membrana basal (88). Las fibras de la membrana basal están dispuestas de manera que se ajustan a las células de músculo liso al ser sometidas a presión, manteniendo los grupos de células unidos e impidiendo una dilatación excesiva. Este sistema altamente integrado evita que se pueda distender un elemento de la misma sin que se distiendan los demás y su elasticidad es la que le aporta la distensibilidad al vaso, atenuando su carga mecánica durante la sístole (89).

Las fibras de elastina no paralelas, por su parte, son las que permiten cambiar el diámetro arterial en respuesta a estímulos neurohumorales, controlando la presión arterial y el flujo del vaso sanguíneo al modificar su calibre.

Las arterias se clasifican así en elásticas o musculares en función de la proporción de componentes celulares y fibrosos que posean en esta capa (90). Las arterias elásticas son aquellas de gran calibre, próximas al corazón, con una lamela elástica bien definida y menor proporción de fibras de células y tejido conectivo, mientras que las arterias musculares, predominantes en las ramas de las anteriores, presentan una mayor proporción de células de músculo liso.

La lámina elástica externa constituye la porción más superficial de la capa media y consiste en una lámina de fibras elásticas que la separan de la adventicia.

- **Adventicia:** Esta capa se localiza entre la lámina elástica externa y el tejido conectivo perivascular. Presenta una baja proporción de células, predominantemente fibroblastos, y su grosor varía a lo largo del árbol vascular. A este nivel se localizan las fibras nerviosas vasomotoras que contribuyen a la regulación funcional del músculo liso de la pared arterial produciendo vasoconstricción a través de receptores adrenérgicos y vasodilatación mediante la activación de receptores β . También se localizan a este nivel los *vasa vasorum* que nutren la adventicia y la parte externa de la capa media de la pared vascular, mientras que la íntima y la porción interna de la capa media reciben los nutrientes a través de difusión desde la luz del vaso.

2.1.8.2. Anatomía de la pared arterial aneurismática

Las tres capas mencionadas previamente están implicadas de alguna manera en la degeneración aneurismática de la pared arterial.

- **Íntima:** Como se ha indicado en el apartado anterior, el endotelio localizado en la capa íntima se trata de una estructura altamente especializada que regula la interacción entre células y proteínas circulantes en el flujo sanguíneo y las estructuras de la pared vascular de forma activa. Las células endoteliales participan en la degeneración de la pared mediante la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS en sus siglas en inglés) que, como se explicará más adelante,

están implicadas en la formación de AAA por aumento del estrés oxidativo. A su vez, la desestructuración de esta capa, puede conllevar la aparición de trombo intraluminal que se asocia al debilitamiento de la pared al producir una situación de hipoxia a dicho nivel (91) y promover la inflamación y apoptosis celular (92).

- **Capa media:** A este nivel se producen la mayor parte de las alteraciones de la pared relacionadas con la formación, crecimiento y rotura de AAA. Durante la degeneración aneurismática de la aorta, disminuye de forma dramática la presencia de fibras de elastina a este nivel alterando la fuerza tensional del vaso. El colágeno, por su parte, presenta menor elasticidad, pero mayor fuerza tensional, añadiendo resistencia a la pared cuando la presión es elevada para impedir una dilatación excesiva. De este modo, la rotura de un AAA ocurre cuando las fibras de colágeno de la capa media y adventicia no son capaces de mantener la integridad estructural de la pared.

Las células de músculo liso de esta capa, tienen también un papel central en la patogénesis del aneurisma. En condiciones fisiológicas producen los componentes de la matriz extracelular (incluyendo la elastina y el colágeno ya mencionados), adaptándose a las necesidades de la arteria mediante un proceso de remodelamiento. En los AAA estas células se encuentran muy disminuidas y, además, existe una disfunción de las células existentes que contribuyen a la progresión del aneurisma mediante la producción de proteasas que degradan la matriz extracelular como las *Matrix Metalloproteinase* MMP-2 y MMP-9.

- **Adventicia**: Esta capa responde a alteraciones externas mediante una respuesta inflamatoria, fibrótica y angiogénica (93). Esta última ha sido objeto de debate en cuanto a su relación con la patogenia del aneurisma. A pesar de que no se ha podido confirmar la hipótesis de que una disminución en la densidad de *vasa vasorum* podría producir una degeneración aneurismática, sí se ha encontrado un aumento de neovascularización de la adventicia mediada por inflamación en AAA y aún mayor en zonas de rotura (94). Sin embargo, aún se desconoce si esta formación neocapilar participa en la patogénesis del aneurisma o es una mera consecuencia de la inflamación de la pared arterial a dicho nivel.

2.1.8.3. Mecanismos etiopatogénicos implicados en la formación de AAA.

Como ya se ha indicado, el AAA constituye la forma más común de patología aneurismática arterial en humanos, por lo que los esfuerzos para estudiar la fisiopatología de esta enfermedad se han centrado en su mayoría en la aorta abdominal.

Desde las primeras investigaciones que plantearon hace más de 20 años que el AAA podía presentar un proceso fisiopatológico diferente al de la aterosclerosis, se ha avanzado mucho en la investigación de las causas y mecanismos de la enfermedad. Sin embargo, su etiopatogenia aún no ha sido del todo esclarecida.

Actualmente, se considera que existen distintos mecanismos que participan en la formación del AAA: actividad proteolítica en la pared arterial, cambios en las células parenquimatosas, mecanismos inflamatorios e inmunitarios a dicho nivel y estrés oxidativo.

2.1.8.3.1. Actividad proteolítica en la pared arterial

La degradación de la matriz extracelular en la pared aórtica es considerada uno de los principales mecanismos implicados en el crecimiento de los AAA (95, 96). La destrucción de la capa media en el AAA se caracteriza por eliminar casi por completo los elementos estructurales normales a dicho nivel y en particular las fibras elásticas. Dado que en condiciones normales la elastina es extremadamente resistente, la investigación sobre la fisiopatología del AAA se ha centrado en el limitado número de procesos enzimáticos capaces de producir elastolisis. Estas enzimas elastolíticas aumentadas en los AAA incluyen la elastasa neutrofílica y diversos tipos de MMP. A pesar de haberse identificado otras enzimas elastolíticas en el tejido aneurismático, la acción de las MMP ha sido bien caracterizado y se cree que tienen un papel central en su patogenia.

Las MMP son una familia de enzimas degradadoras de la matriz extracelular que resultan esenciales en numerosos procesos homeostáticos fisiológicos, incluyendo la cicatrización de heridas, la angiogénesis, la remodelación tisular o la resorción ósea. Los precursores de estas enzimas, los pro-MMP, son producidos por neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células de músculo liso. Estos precursores se activan mediante la acción de proteinasas extracelulares como la plasmina, activadores del plasminógeno y otras MMP, mientras que su actividad puede ser inhibida por la liberación a nivel local de inhibidores biológicos de su actividad como los TIMP (siglas en inglés de inhibidores tisulares de metaloproteinasas).

Además de este control a nivel de activación extracelular e inhibición local, su actividad puede controlarse también a través de la inducción o supresión de la transcripción de los

genes implicados en su formación. La delección de genes que codifican la expresión de TIMP conlleva un aumento del tamaño aneurismático a nivel experimental, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que los AAA resulten de un desequilibrio local o sistémico entre la producción de MMP y TIMP (97). Sin embargo, en muestras de tejido de pacientes con AAA se ha demostrado un aumento de la producción de TIMP, por lo que esta relación no es tan clara a nivel clínico.

Aunque se han descrito numerosas MMP implicadas en la formación de AAA (cuyas características se resumen en la **Tabla 2.1**), hay dos MMP que tienen un papel principal en esta patología:

- **MMP-9 (Gelatinasa B o Gelatinasa 92 kDa):** Esta enzima participa en la degradación de elastina, colágeno tipo I y IV y fibrinógeno. La MMP-9 ha suscitado un interés especial en la patogenia del AAA debido a que se trata de la gelatinasa producida en mayor cantidad por el tejido aneurismático y con la mayor diferencia de expresión entre tejido sano y muestras de AAA (98, 99).

La principal fuente de esta enzima son los macrófagos de la pared arterial, pero también puede ser producida por las células de músculo liso de la capa media y fibroblastos de la adventicia, especialmente en condiciones de inflamación.

Los niveles de MMP-9 también se encuentran aumentados en el plasma de pacientes con AAA y dicho aumento de expresión se correlaciona con la progresión del AAA aún más que su tamaño (100-102). Del mismo modo, se ha

demostrado protección frente a la formación de aneurismas en ratones *knockout* para la MMP-9, en los que la lámina elástica se encuentra morfológicamente preservada (103).

- **MMP-2 (Gelatinasa A):** Al igual que la MMP-9, puede degradar elastina y colágeno tipo IV y es producida por células de músculo liso y fibroblastos.

La expresión de MMP-2 se encuentra más aumentada que la de MMP-9 en aneurismas de pequeño tamaño (104), pero no en aortas sanas ni afectadas por aterosclerosis (105), por lo que se ha sugerido que pueda estar implicada en las etapas iniciales del desarrollo del AAA. Al igual que en la MMP-9, se ha demostrado protección frente al aneurisma en ratones con una producción deficiente de MMP-2 y existen datos experimentales que confirman que ambas MMP deben estar presentes y activas para que progrese la formación de AAA, por lo que puede que exista una relación sinérgica y codependiente de las mismas (106).

Además de las MMP, se han identificado otros tipos de proteinasa implicados en la formación de AAA mediante destrucción directa de la matriz extracelular o mediante la activación de MMP. Las catepsinas, unas cistina-proteasas capaces de catalizar la degradación de elastina en modelos experimentales de aneurismas, se han encontrado aumentadas en muestras de pared aórtica aneurismática tanto en relación a aortas sanas como en relación a aortas ateroscleróticas (107).

Tabla 2.1: Metaloproteinasas de la matriz (MMP) implicadas en la patogénesis de los aneurismas de aorta abdominal.

<i>MMP</i>	<i>Función</i>
<i>MMP-1</i>	Colagenasa
<i>MMP-2</i>	Degradación de Elastina y Colágeno tipo IV
<i>MMP-3</i>	Colagenasa y activación de otras MMP
<i>MMP-8</i>	Colagenasa
<i>MMP-9</i>	Degradación de Elastina, colágeno tipo I y IV y fibrinógeno
<i>MMP-12</i>	Unión y degradación de fibras de elastina
<i>MMP-13</i>	Colagenasa

Por otro lado, la Cistatina C, un inhibidor de cistina-proteasas, se encuentra disminuida en el tejido aneurismático y su delección en modelos experimentales de aneurisma incrementa el tamaño del aneurisma y su tasa de crecimiento (108). La cistein-proteasa dipeptidilpeptidasa I, también aumenta la formación de aneurismas a nivel experimental mediante el reclutamiento de neutrófilos (109).

Por último, y en relación con el objeto de este trabajo, algunas serin-proteasas, particularmente las pertenecientes a la familia del activador del plasminógeno (el activador tisular del plasminógeno y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa), también se han relacionado con la formación de AAA. Estas enzimas actúan sobre el plasminógeno formando plasmina, que es capaz de degradar de forma directa la matriz extracelular, así como de activar metaloproteinasas (110).

2.1.8.3.2. Cambios en las células parenquimatosas

Otra de las características patológicas de la enfermedad aneurismática avanzada es la disminución del número de células de músculo liso en la capa media de la arteria. En muestras de pared aneurismática se ha demostrado un aumento de la apoptosis de dichas células, así como del gen supresor de tumores p53 que interviene en la vía intrínseca de activación del proceso apoptótico (111). Además, las células de músculo liso restante presentan una capacidad proliferativa disminuida respecto a las aortas sanas y pueden producir y secretar MMP en respuesta a estímulos inflamatorios, contribuyendo de forma directa a la formación del aneurisma (112). Esta participación directa en el desarrollo del AAA puede deberse al aumento de la capacidad de estas células de modificar la matriz.

Embriológicamente, estas células en la aorta distal, arterias ilíacas comunes e ilíacas internas derivan de los mismos precursores durante el desarrollo gestacional, mientras que las arterias ilíacas externas se desarrollan más tardíamente a partir de un precursor diferente, lo que podría explicar la resistencia de estas últimas frente a la formación de aneurismas en estos vasos.

2.1.8.3.3. Inflamación y respuesta inmune

Exceptuando la ya mencionada pérdida de elastina en la capa media, el elemento más característico de la pared arterial aneurismática es el infiltrado inflamatorio de su capa media, por lo que se ha estudiado desde hace años su papel en la génesis y progresión de los AAA (113).

Aunque a día de hoy se desconocen los desencadenantes que inician esta reacción inflamatoria en la pared de los AAA, algunos estudios han sugerido que estos pacientes podrían presentar una susceptibilidad genética con una manifestación autoinmune, asociándose la enfermedad aneurismática con ciertos haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad humana (114).

Entre las células inflamatorias presentes en los AAA se encuentran linfocitos T y B, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, células dendríticas y células plasmáticas. La importancia exacta de cada una de estas células y sus interrelaciones son muy variadas y complejas, pero en conjunto ejercen un papel en la patogenia del aneurisma por los dos mecanismos ya explicados: las células inflamatorias capaces de producir MMP y citoquinas (IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral, etc.) producen destrucción directa de la matriz extracelular (115, 116) y, por otro lado, la inducción de apoptosis celular en células de músculo liso impide la regeneración de la matriz por las mismas (117).

El reclutamiento y proliferación de estas células inflamatorias se debe seguramente a la producción de varias citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que han sido implicadas en estos mecanismos, incluyendo la IL-6, IL-8, proteína inflamatoria de

macrófagos 1α y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (118-120). Además, se ha demostrado experimentalmente que los productos de degradación de la elastina y los péptidos hidrofílicos liberados por procesos elastolíticos estimulan y perpetúan el reclutamiento y activación de células mononucleares en la pared aórtica (121). Estos productos se acoplan a las proteínas de unión de la elastina de la superficie celular estimulando la quimiotaxis, activación y fagocitosis de las células mononucleares. Se han encontrado también concentraciones séricas elevadas de estos productos de degradación de la elastina en pacientes con AAA y sus niveles se relacionan con el riesgo de progresión de la enfermedad (122).

Las prostaglandinas también podrían jugar un papel en la patogenia del AAA al estimular en los macrófagos la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6 mediante la activación de su receptor de superficie EP4. Aunque la inhibición de la producción de prostaglandinas mediante indometacina ha demostrado disminuir la producción de ciclooxigenasa-2, prostaglandina-E2 y MMP-9, limitando el crecimiento en AAA experimentales, estudios posteriores han cuestionado la importancia de esta vía (123).

Finalmente, también se han encontrado niveles aumentados de citoquinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-5 e IL-10 en los AAA, sugiriendo que existe una respuesta endógena frente a los estímulos previos que intenta contrarrestar esta situación proinflamatoria (124). Por lo tanto, el equilibrio entre esta situación pro- y antiinflamatoria, podría jugar un papel clave en la evolución del AAA, explicando en parte las diferencias inter- e intraindividuales en las tasas de crecimiento y rotura del mismo.

2.1.8.3.4. Estrés oxidativo

Numerosos estudios han identificado el estrés oxidativo como un mecanismo relacionado con la formación de AAA (125). Este se produce como consecuencia de un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los radicales libres (RL) generados de forma endógena en procesos fisiológicos, y la actividad antioxidante que se opone a estos (126).

Los RL son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados. Se forman a partir de la rotura homolítica de una molécula y son altamente inestables y reactivos, presentando una vida media corta. Las ROS son especies químicas reactivas que presentan oxígeno en su estructura, pudiendo tener o no tener electrones desapareados. La alta reactividad de ambos, hace que tanto las ROS como los RL puedan iniciar reacciones en cadena al adquirir un electrón para estabilizarse, convirtiéndose a su vez en RL a las moléculas de las que toman dicho electrón y pudiendo reaccionar éstas con otras estructuras como proteínas, lípidos o DNA (127).

RL y ROS pueden producirse por situaciones patológicas tales como la inflamación, pero en condiciones fisiológicas se generan pequeñas cantidades de ROS como el anión superóxido, radicales hidroxilo o peróxido de hidrógeno a partir del metabolismo aerobio en respuesta a estímulos internos y externos. Al usar oxígeno como aceptor de electrones en los últimos pasos de la cadena respiratoria dentro de la mitocondria, se genera un 97-98% de agua y un 2-3% de ROS. Estas pequeñas cantidades de ROS resultan imprescindibles en numerosos procesos relacionados con la proliferación o apoptosis celular, con la inmunidad o con la señalización intracelular (128).

Además de estos elementos de la cadena respiratoria mitocondrial, otras fuentes productoras de ROS en nuestro organismo son la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la hemo oxigenasa, la NADH/NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS).

El desequilibrio entre producción y destrucción de ROS genera una situación de estrés oxidativo produciendo el daño tisular. Este desequilibrio puede ocasionarse tanto por la producción aumentada de ROS, como por la disminución de los mecanismos que inactivan estas especies mediante antioxidantes celulares y enzimas endógenas (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa).

El estrés oxidativo, a su vez, induce un proceso de señalización proinflamatoria que desencadena daño celular y apoptosis, como ya hemos visto en los apartados anteriores. Algunas de estas ROS, como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, producidas en fibroblastos, leucocitos infiltrados en la pared y células de músculo liso, originan a su vez un reclutamiento de otras células inflamatorias e inhiben el PAI-1 (Inhibidor de la activación del plasminógeno 1), una enzima que limita la activación de MMP.

Todos estos marcadores de estrés oxidativo se han encontrado significativamente elevados en muestras de AAA con respecto a tejido aórtico sano (125) y se han identificado diversas fuentes de ROS en este tejido, incluyendo reacciones del metabolismo lipídico por la ciclooxigenasa o la alteración de la producción de NO en el endotelio. Sin embargo, la principal fuente de ROS en el tejido aneurismático es la NADPH oxidasa, cuya actividad se ve aumentada por la acción de citoquinas secretadas

por macrófagos, linfocitos y células de músculo liso, así como por otros reguladores como la angiotensina II, los leucotrienos o las lipoproteínas de baja densidad oxidadas. Estudios en modelos murinos de AAA han confirmado que las NADPH oxidasas e incluso el isotipo 2 de la NOS son fuentes importantes de producción de RL en aneurismas aórticos.

La depleción de estas enzimas en ratones (129) al igual que la depleción de la NOS (123) consiguen atenuar el desarrollo de AAA en condiciones experimentales, preservándose la estructura de la pared aórtica. También se ha conseguido inhibir la progresión aneurismática a nivel experimental mediante el aumento de enzimas antioxidantes como la hemo-oxigenasa 1 o la adición de vitamina E, aunque estos efectos no se hayan mantenido en ensayos clínicos con administración de antioxidantes a los pacientes.

Mediante todos estos mecanismos descritos, el estrés oxidativo colabora con la activación de proteasas y la inflamación en la pared aneurismática contribuyendo a la degradación de proteínas estructurales y debilitando así la pared de la aorta abdominal (130, 131).

2.2. HEMOSTASIA Y COAGULACIÓN

Los procesos de coagulación y fibrinólisis representan el principal mecanismo de defensa del sistema vascular. Las fuerzas opuestas de formación del trombo de fibrina y la disolución del mismo mantienen la hemostasia y preservan la función vascular y su integridad. Los eventos procoagulantes que culminan en la generación del trombo protegen a los vasos frente a las lesiones perforantes y la pérdida sanguínea, mientras que la fibrinólisis elimina dicho trombo e inicia mecanismos relacionados con la reparación y regeneración del tejido.

En este proceso juegan un papel fundamental células endoteliales y circulantes, así como sus proteínas de membrana y tejido perivascular. Estos tres compartimentos producen una respuesta integrada y han de mantener un equilibrio entre sus funciones procoagulantes, anticoagulantes y fibrinolíticas para prevenir un sangrado o una formación excesiva de trombo.

2.2.1. Hemostasia

La hemostasia es un proceso activo propio del sistema vascular destinado a detener la hemorragia. Se desarrolla en tres fases: vasoconstricción refleja, hemostasia primaria o agregación plaquetaria y hemostasia secundaria o coagulación.

2.2.1.1. Vasoconstricción refleja

Se trata de una respuesta inmediata y pasajera tras producirse el daño vascular que genera una disminución del área del vaso y el flujo a dicho nivel mediante una contracción de las fibras musculares de la pared, disminuyendo las pérdidas sanguíneas.

Esta respuesta está controlada por mecanismos reflejos mediados por el sistema nervioso simpático y mediadores de acción local como la endotelina y el tromboxano A₂ (132, 133). Esta vasoconstricción, además, favorece la acumulación de células sanguíneas cerca de la región del vaso lesionada, facilitando la interacción entre las plaquetas y la pared vascular e iniciándose así la siguiente fase de la hemostasia.

2.2.1.2. Hemostasia primaria

Proceso por el cual se produce el tapón plaquetario a través de la adhesión, activación, secreción y agregación plaquetaria. Como se ha visto anteriormente, distintos

mecanismos de la pared vascular sana impiden la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular. Sin embargo, al producirse una lesión, queda expuesto el colágeno subendotelial y esto permite que se adhieran las plaquetas a dicho nivel. Las plaquetas se unen al vaso a través de receptores de membrana específicos como la glicoproteína Ib/IX/V, que se une al factor de von Willebrand del tejido subendotelial, o la glicoproteína IIb/IIIa que sirve para unir plaquetas entre sí mismas y a la pared vascular. Otros receptores de colágeno como la glicoproteína Ia/IIa promueven la activación y agregación plaquetaria (134).

Estas plaquetas activadas cambian de forma y segregan diferentes sustancias contenidas en sus gránulos α y δ como tromboxano A₂, factor V, ATP, calcio, serotonina, factor plaquetario 4, factor de crecimiento derivado de plaquetas y fibrinógeno. Todas estas sustancias favorecen el reclutamiento y agregación de otras plaquetas, y la unión del fibrinógeno plasmático a la glicoproteína IIb-IIIa activada estimula la formación de una red de colágeno y plaquetas que constituyen este trombo primario.

2.2.1.3. Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria o coagulación consiste en una serie de procesos con diferentes reacciones enzimáticas que llevan a la conversión del fibrinógeno en fibrina. Esta fibrina es capaz de polimerizar y atrapar otras plaquetas, células circulantes y plasma, formando así el coágulo secundario, que es estable e insoluble a diferencia del primario mencionado previamente (135). En la **Figura 2.9** se puede observar que, tanto la vía intrínseca o de contacto iniciada sobre el colágeno subendotelial como la vía extrínseca, iniciada por el factor tisular, convergen en la transformación del factor X a factor X activado (factor Xa o FXa), que cataliza la conversión de protrombina a trombina activa.

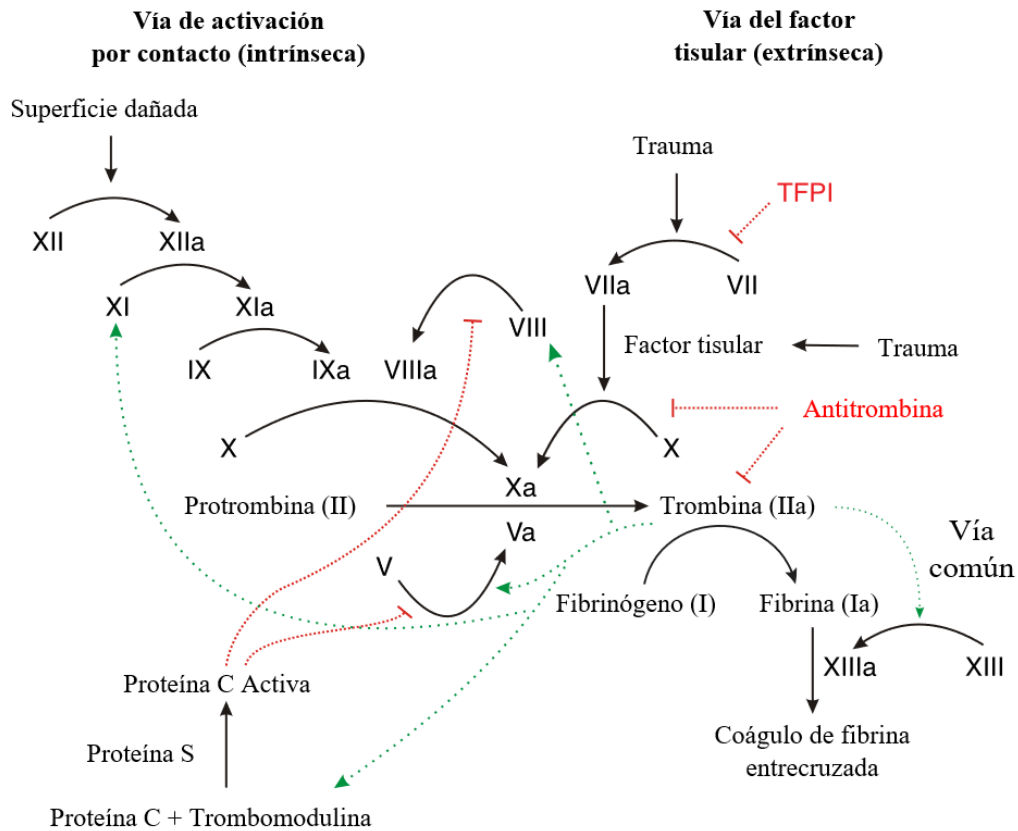


Figura 2.9: Vías intrínseca y extrínseca de la coagulación. *Fuente:* https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coagulation_full.svg

2.2.2. Factor Xa y efectos pleiotrópicos del factor Xa

Como ya se ha indicado, el factor X de la coagulación, también conocido por su epónimo “factor de Stuart-Prower”, es una serin-proteasa que cataliza la conversión proteolítica de protrombina a trombina activa.

Su síntesis a nivel del hígado depende de la vitamina K, siendo un factor muy estable en condiciones fisiológicas a 37°C y pH entre 6 y 9, degradándose e inactivándose al salir de estos valores.

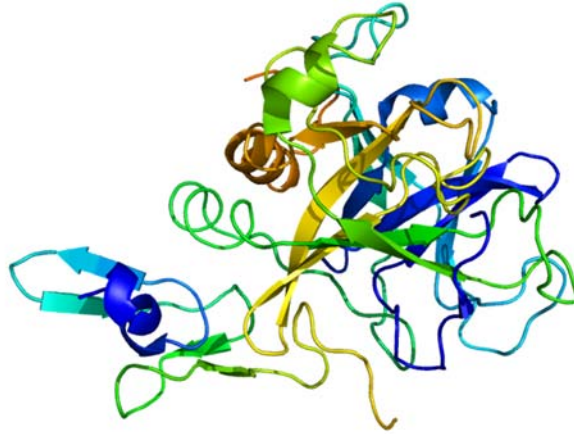


Figura 2.10: Estructura tridimensional del FXa. *Fuente:* https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_F10_PDB_1c5m.png

Aunque es conocido el papel del FXa en la coagulación, diferentes estudios han sugerido también efectos directos adicionales de dicho factor en la pared vascular (136, 137). Los primeros estudios a este respecto, encontraron una respuesta hipotensiva al FXa en ratas que era mediada por una liberación aumentada de NO así como aumento de expresión génica de citoquinas proinflamatorias (138). Esta relajación arterial producida por el FXa y mediada por la liberación de NO por el endotelio ha sido confirmada en estudios in vitro (139).

Muchos estudios han analizado también los efectos mitogénicos del FXa y su aumento de la expresión de citoquinas implicados en la remodelación tisular y la fibrosis, que participan en la reparación de tejidos dañados tras activarse el mismo durante la hemostasia (140, 141). Esta acción mitógena del FXa se ha demostrado en células de músculo liso de aorta en ratas (142) así como en otras células endoteliales (143, 144).

En relación con los mecanismos patogénicos de los AAA, se ha demostrado que el FXa aumenta el estrés oxidativo en células de músculo liso vascular humanas de la vena safena (145, 146) y aumenta la liberación de factores proinflamatorios como la IL-6 en células de músculo liso de arteria coronaria (136) y la IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) en células endoteliales (147, 148).

Además, en arteria femoral de pacientes diabéticos, el FXa modifica el nivel de expresión de proteínas asociadas con estrés oxidativo y metabolismo energético, un efecto que es evitado por el rivaroxabán (149). Por último, la inhibición de los factores Xa/IIa mediante infusión de enoxaparina y fondaparinux (150) o del FXa mediante rivaroxabán (151) han conseguido disminuir la severidad o incluso prevenir las lesiones ateroscleróticas y aneurismáticas en modelos experimentales de aneurisma con ratones con deficiencia en apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) infundidos con angiotensina II (AngII).

Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura hasta la fecha ningún estudio que examine los posibles efectos del FXa endógeno en proteínas asociadas con inflamación o estrés oxidativo en AAA humanos.

2.2.3. Coagulación y aneurismas

Otro fenómeno importante asociado con los aneurismas y su riesgo de rotura es la presencia de trombo mural en la luz de los mismos (152), el cual está presente en alrededor del 75% de los AAA (91). A este respecto, se han encontrado niveles aumentados de ciertos factores relacionados con la coagulación en pacientes con AAA (153).

Estas proteínas asociadas clásicamente con la trombosis y la regulación de la cascada de la coagulación, pueden participar también en la patogenia de los AAA: los pacientes con AAA presentan una concentración tres veces mayor de proteína activada C (APC) y su inhibidor (PCI), relacionadas con la producción aumentada de trombina, respecto a controles sanos y los niveles de estas sustancias se correlacionan con el diámetro aneurismático (154).

Las plaquetas activadas son una fuente de FXa (155), por lo que las plaquetas contenidas en el trombo aórtico pueden contribuir al aumento de concentraciones locales de este factor en el sitio aneurismático (156).

Por otro lado, las autopsias realizadas en pacientes que murieron por aneurismas rotos han demostrado que la mayoría de roturas se localizaban debajo de trombo intraluminal, sugiriendo que el trombo participa en el crecimiento y debilitación de la pared arterial (157). Además, el trombo y la coagulación se han asociado al remodelamiento destructivo de la aorta, al disminuir la fuerza y elasticidad de la pared vascular (92, 158).

Por último, la presencia de trombo abundante podría conllevar cambios en las rutas metabólicas utilizadas para obtener ATP en la pared aórtica, al atenuar dicho trombo la difusión de oxígeno a la pared del AAA produciendo hipoxia localizada en el lugar de interacción del trombo con el aneurisma (91, 159).

2.3. RIVAROXABÁN

2.3.1. Descripción del fármaco, farmacocinética y farmacodinámica

El rivaroxabán es un inhibidor directo del FXa altamente selectivo, con elevada biodisponibilidad oral (160). Este fármaco es un derivado oxazolidinona optimizado para unirse con el FXa (161).

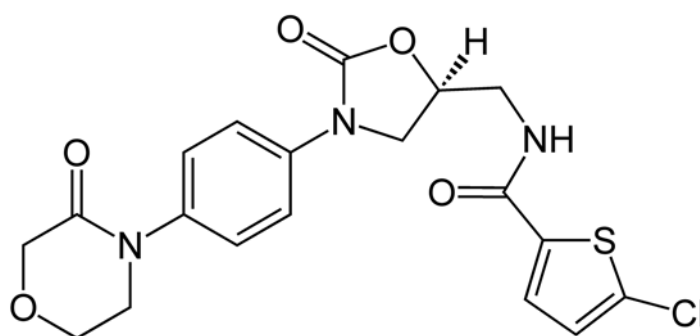


Figura 2.11: Estructura química del rivaroxabán. *Fuente:* <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rivaroxaban2DCSD.svg>

La inhibición del FXa interrumpe las vías intrínseca y extrínseca de la cascada de la coagulación de la sangre, inhibiendo la formación de trombina y evitando así la formación de trombos (162). En humanos, la inhibición de la actividad del FXa es competitiva y dosis dependiente, correlacionándose estrechamente la concentración plasmática con la modificación del tiempo de protrombina (constante de inhibición $[K_i]$, 0,4 nmol / L) (163), por lo que no se recomienda monitorización de la actividad inhibitoria del FXa en pacientes tratados con este fármaco.

La absorción oral de rivaroxabán es casi completa, presentando una biodisponibilidad oral de entre el 80% y el 100%, independientemente de las condiciones de ayuno o ingesta de alimentos. Esta absorción oral se realiza en un corto periodo de tiempo, alcanzándose concentraciones máximas entre las 2 y las 4 horas tras la ingesta y presentando un rápido inicio de acción (162).

Tabla 2.2: Ficha rivaroxabán.

<i>Rivaroxabán</i>	
Fórmula molecular	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S
Peso molecular	435,88132 g/mol
Código ATC:	B01AF01
Grupo farmacoterapéutico	Inhibidores directos del factor Xa
Nombre comercial	Xarelto (BAY 59-7939)
Titular de la autorización de comercialización	Bayer Pharma AG D-13342. Berlin Alemania
Números de autorización de comercialización	EU/1/08/472/025-035, EU/1/08/472/041, EU/1/08/472/046-047
Patentes	7592339; 7585860; 7157456

La unión del fármaco al sitio activo del FXa se realiza de forma directa, sin necesidad de cofactores (a diferencia del fondaparinux o la heparina) e inhibe dicho factor con una selectividad mucho mayor que otras serinas como la tripsina, la plasmina, la uroquinasa,

el factor VIIa, el factor IXa o la proteína C activada (164). El rivaroxabán no inhibe la trombina (factor II activado) y no se han demostrado efectos sobre las plaquetas.

La unión del fármaco a proteínas plasmáticas es del 92-95% en humanos, principalmente a la albúmina sérica. Su volumen de distribución es moderado, en torno a los 50 litros en sujetos sanos (165).

Dos terceras partes de la dosis administrada del fármaco se metaboliza por el CYP3A4, el CYP2J2 y otros mecanismos independientes de CYP, eliminándose después un 50% por vía renal y el otro 50% por vía fecal. El tercio restante es excretado por la orina como principio activo sin metabolizarse previamente mediante secreción renal activa. El aclaramiento sistémico es bajo (10 l/h), siendo la semivida de eliminación de unas 4,5 horas tras administración intravenosa de una dosis de 1 mg. Tras la administración oral esta eliminación se ve alterada por la tasa de absorción, siendo la semivida de unas 5-9 horas en personas jóvenes y 11-13 horas en personas de edad avanzada (162).

2.3.2. Indicaciones terapéuticas

El rivaroxabán ha sido aprobado tanto por la Agencia Europea del Medicamento en la Unión Europea como por la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos para las siguientes indicaciones (162, 165):

- Prevención de ictus cardioembólico en pacientes con fibrilación auricular no valvular.
- Prevención de enfermedad tromboembólica venosa en pacientes sometidos a cirugía traumatológica de sustitución articular con prótesis de cadera o rodilla.

- Tratamiento de trombosis venosa profunda o tromboembolismo pulmonar de cualquier causa, así como prevención de enfermedad tromboembólica venosa recurrente.
- Profilaxis de episodios aterotrombóticos en pacientes con cardiopatía isquémica o enfermedad arterial periférica sintomática con alto riesgo de episodio isquémico.
- Profilaxis de episodios aterotrombóticos tras síndrome coronario agudo en pacientes con marcadores cardíacos elevados en combinación con antiagregantes plaquetarios.

2.4. PROTEÓMICA

La proteómica es la rama de la ciencia que se dedica al estudio a gran escala de las proteínas, particularmente, la función y estructura de las mismas. Este campo de estudio incluye diversas técnicas que permiten identificar, separar y cuantificar las proteínas presentes en una muestra biológica, así como monitorizar los cambios de expresión de varias proteínas que forman parte de un proceso metabólico en una muestra y analizar las interacciones entre ellas.

El conjunto de proteínas producido o modificado por un organismo o sistema constituyen su proteoma que, a diferencia del genoma funcional complementario de éste, es distinto en cada célula o sistema y varía con el tiempo. Esta característica hace que el proteoma refleje el estado funcional de la célula pudiendo mostrar cambios rápidos y específicos en respuesta a diferentes estímulos o procesos.

Al comportarse de forma dinámica, el conjunto de proteínas presentes en una célula, tejido u organismo representa un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en dicho momento.

El *splicing* o empalme alternativo en la transcripción del ARN a partir del ADN produce isoformas diferentes de una proteína que, a su vez, pueden sufrir modificaciones postraduccionales que alteran la estructura, comportamiento y función de la misma. Esto posibilita la formación de diferentes proteínas a partir de un mismo gen, por lo que el proteoma no puede ser inducido directamente por la información estática que aporta el genoma de la célula o el organismo y precisa de técnicas específicas para su determinación (166, 167).

Entre estas técnicas, se incluye la electroforesis mono y bidimensional, la cromatografía líquida, la espectrometría de masas, la detección de proteínas mediante anticuerpos (inmunoensayos), análisis de imagen, degradación de Edman, secuenciación de aminoácidos y análisis bioinformáticos (168).

Estas técnicas aportan información cuantitativa al determinar tanto la presencia o ausencia de una determinada proteína como la cantidad de la misma y cambios en la expresión producidos por estímulos fisiológicos o patológicos al comparar los resultados experimentales con los de la muestra basal. Además de estos datos cuantitativos, la evolución de técnicas como la espectrometría de masas ha permitido el análisis cualitativo mediante la detección de distintas isoformas de una misma proteína. Esta información ha ayudado a profundizar en el estudio de diferentes patologías, debido a los cambios en el comportamiento y función de la proteína que pueden ocasionar tanto las alteraciones en la transcripción como las modificaciones postraduccionales.

De este modo, la proteómica permite obtener información sobre la expresión, localización, estructura, actividad, mecanismo de actuación e interacciones con el medio de las proteínas y aporta datos fundamentales para comprender estados fisiológicos y patológicos de nuestro organismo y desarrollar dianas terapéuticas para los mismos.

2.4.1. Aplicación de la proteómica en los AAA

Uno de los usos más prometedores de la proteómica en medicina es el estudio de espectros proteicos diferenciales entre pacientes con una determinada enfermedad y controles sanos, de forma que se puedan hallar marcadores diagnósticos o pronósticos de dicha enfermedad analizando las proteínas presentes en una muestra biológica. Esta aplicación de la proteómica ha conseguido encontrar marcadores biológicos en orina y suero, con potenciales aplicaciones en enfermedades renales, oncológicas, reumatológicas e incluso en aterosclerosis (169-171).

Como ya se ha indicado, los AAA suelen cursar de manera asintomática, su evolución sigue siendo poco predecible y la rotura de los mismos resulta letal en la mayoría de los casos, por lo que el hallazgo de un marcador diagnóstico o pronóstico de esta enfermedad sería de gran utilidad para disminuir la morbimortalidad asociada a esta patología. Por ello, diferentes estudios han tratado de encontrar marcadores biológicos que ayuden a predecir la formación, crecimiento y rotura de AAA. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido validado hasta la fecha y no se encuentran disponibles en la práctica clínica diaria (172).

Algunos de estos marcadores propuestos han sido la apolipoproteína C1 y la MMP-9, que han sido estudiados en modelos con ratones ApoE^{-/-} (173) como marcadores diagnósticos de AAA. No obstante, en este estudio no se analizó la influencia en la progresión y rotura de los mismos. Otros estudios han identificado algunas proteínas de matriz extracelular y la IL-6 como marcadores pronósticos de progresión acelerada y rotura (174).

No obstante, la sensibilidad y especificidad de estos marcadores descritos sigue siendo baja, por lo que no presentan hasta ahora una utilidad clínica relevante (175).

El primer análisis proteómico a gran escala en muestras de pared aórtica humana, mostró diferencias significativas en el proteoma de las muestras aneurismáticas respecto a las de pacientes con arterias sanas o ateroscleróticas (176). En este análisis se obtuvieron más de cien proteínas diferentes en los AAA respecto a los controles, pudiendo identificarse 25 de ellas, con una probable implicación de la mayoría de estas en la patogénesis del aneurisma.

Aunque la relevancia clínica de estos marcadores en el diagnóstico y pronóstico de los AAA sigue siendo muy limitada, los datos obtenidos de estos estudios han ayudado a entender mejor la patogenia de la enfermedad y a día de hoy continúa la búsqueda de nuevos marcadores dado el papel fundamental que pueden tener en esta enfermedad en el futuro (177).

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Los AAA siguen siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en nuestro medio, llegando a ser la decimoquinta causa de muerte global en occidente. A día de hoy no existe ningún tratamiento médico que sea capaz de prevenir la aparición de AAA o evitar su crecimiento y rotura de forma efectiva.

Los mecanismos implicados en el desarrollo de esta enfermedad han sido ampliamente estudiados y se ha demostrado el papel fundamental que tienen la degradación de la matriz extracelular por metaloproteinasas, la inflamación, el estrés oxidativo y las alteraciones producidas por el trombo mural en estos.

El FXa, además de presentar un papel fundamental en la coagulación y hemostasia, ejerce acciones directas sobre la pared vascular alterando el metabolismo energético y aumentando el estrés oxidativo y la inflamación a dicho nivel. Este factor podría estar aumentado en AAA debido a la presencia de trombo mural y, por tanto, estar implicado en los mecanismos patogénicos de formación y crecimiento de los mismos.

Si esto fuera así, el FXa podría ser una nueva diana terapéutica para la prevención y tratamiento médico de AAA. No obstante, a día de hoy no existe ningún estudio que haya analizado esta posible relación del FXa endógeno con los mecanismos implicados en la patogenia de AAA humanos.

El rivaroxabán, un inhibidor del FXa, ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antiestrés oxidativo en enfermedades que comparten factores etiopatogénicos con los AAA, tales como la aterosclerosis. No obstante, no se ha estudiado aún el efecto de este fármaco en AAA humanos.

Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es que el FXa podría estar implicado en los mecanismos patogénicos de formación y crecimiento de AAA. Si se pudiera revertir esta acción mediante la inhibición del mismo con rivaroxabán, se abriría una puerta a un posible tratamiento médico de esta enfermedad que actuara mediante la inhibición de sus mecanismos etiopatogénicos.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente tesis son:

1. Analizar el nivel de expresión del FXa en la pared arterial de AAA humanos y compararlo con los niveles presentes en explantes aórticos de controles sanos.
2. Evaluar el nivel de expresión de biomoléculas relacionadas con la inflamación (IL-6, IL-10 y forma inducible de la NOS) en muestras de AAA y analizar si existen diferencias en relación con la pared aórtica sana.
3. Evaluar in vitro si el rivaroxabán puede modificar el nivel de expresión de estas proteínas asociadas con la inflamación en AAA.
4. Evaluar el nivel de expresión de biomoléculas relacionadas con el estrés oxidativo (subunidades de la NADPH oxidasa) en muestras de AAA y analizar si existen diferencias en relación con la pared aórtica sana.
5. Evaluar in vitro si el rivaroxabán puede modificar el nivel de expresión de estas proteínas asociadas con el estrés oxidativo en AAA.
6. Analizar los niveles de MMP-9 presentes en muestras de AAA y compararlos con los niveles existentes en la aorta de controles sanos.

7. Estudiar la asociación de los niveles de MMP-9 con la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo en los explantes aórticos.

8. Determinar el posible efecto del rivaroxabán en la expresión de MMP-9 en los aneurismas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE AORTA

Se incluyeron en el estudio muestras de pared aórtica aneurismática de seis pacientes en los que se realizó cirugía abierta electiva de reparación de AAA mediante resección del aneurisma e interposición de una prótesis vascular en el servicio de cirugía vascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (España). Las muestras se tomaron de la porción más dilatada de la aorta infrarrenal (>5cm).

Para ser incluidos en el estudio, los pacientes no debían haber estado bajo tratamiento con anticoagulantes durante los doce días previos a la cirugía. Se excluyeron también los pacientes con síndrome de Marfan, aneurismas inflamatorios, sintomáticos o rotos, enfermedad sistémica de carácter inflamatorio, infeccioso u oncológico y/o aquellos pacientes con antecedentes de cualquier otra intervención quirúrgica en los seis meses previos a la cirugía.

La presencia de trombo intraluminal en el AAA fue evaluada mediante tomografía computarizada (TC), que fue utilizada también para descartar la presencia de dilatación aneurismática en la aorta torácica y determinar el diámetro de la aorta abdominal y las características anatómicas del aneurisma.

Las muestras de control de aorta abdominal no aneurismática se tomaron durante la extracción de órganos de seis donantes fallecidos por traumatismo craneoencefálico. Estos injertos de control fueron tomados durante el explante del bloque renal (riñón y

pedículo) recogiendo una muestra a nivel inmediatamente infrarrenal. El diámetro aórtico fue determinado antes de la extracción de la arteria mediante un calibre quirúrgico. Ninguno de los controles de aorta abdominal sana presentaba trombo intraluminal.

Este estudio fue realizado según los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y el protocolo fue aprobado por el comité de ética institucional del Hospital Clínico San Carlos de Madrid con el código C.I.14/509-E. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. En el caso de los donantes de órganos, las muestras aórticas para los controles fueron obtenidas con consentimiento de sus familiares.

5.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE AORTA

Las muestras de aorta fueron lavadas cuidadosamente con suero salino isotónico inmediatamente tras la extracción. Se retiró el trombo de las muestras y se limpió la sangre, grasa y tejidos adyacentes presentes en las mismas, cortándolas en porciones de aproximadamente 5 mm cada una. Cada uno de los fragmentos de aorta aneurismática fue incubado en presencia y ausencia de 50 nmol/L de rivaroxabán (Bay 59-7939, diluido en dimetil sulfóxido [DMSO], con una concentración final del 1%) en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Para ello se utilizó el medio RPMI 1640 *Gibco® (Invitrogen Corporation, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)* sin rojo fenol (nº catal.11835-063) para evitar alteraciones en el análisis posterior mediante métodos colorimétricos. Este medio se suplementó con 1% de suero fetal bovino, 5 mmol/L de glutamina, 0,01 mmol/L de L-arginina, 2×10^{-5} µg/L de estreptomicina y 2×10^{-5} U/L de penicilina.

Para determinar la concentración de rivaroxabán a utilizar para los experimentos in vitro, se realizó una curva de concentración-respuesta, estudiando si concentraciones incrementales de rivaroxabán eran capaces de inhibir el contenido en trombina del AAA. La misma cantidad de DMSO en la que fue diluido el rivaroxabán fue añadida a las muestras de control y a los segmentos de aorta incubados en ausencia del fármaco.

Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones estériles. Al final del periodo de incubación, se recuperaron de forma separada los explantes aórticos y el sobrenadante. Los explantes fueron congelados inmediatamente a -80°C hasta que se realizaron las determinaciones moleculares. El sobrenadante fue centrifugado a 12000 rpm, a 4°C y el sobrenadante resultante se congeló también a -80°C hasta que se realizaron las determinaciones de citoquinas.

5.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Las muestras se analizaron mediante *Western Blot* utilizando el sistema de Laemmli (178) para determinar los niveles de expresión de subunidades de la NADPH oxidasa citosólica y mitocondrial, de la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), el FXa y MMP-9.

Esta técnica analítica, conocida también como inmunoblot, es capaz de detectar proteínas específicas en una muestra biológica, normalmente en muestras complejas con distintas proteínas, como un extracto tisular. Para ello, se separan las proteínas de dicha muestra mediante electroforesis en geles desnaturizantes, que hacen que pierdan su conformación tridimensional, obteniéndose un fraccionamiento que obedece a un criterio

concreto: su peso molecular, su tamaño (longitud de la cadena), su forma o estructura, hidrofobicidad, etc.

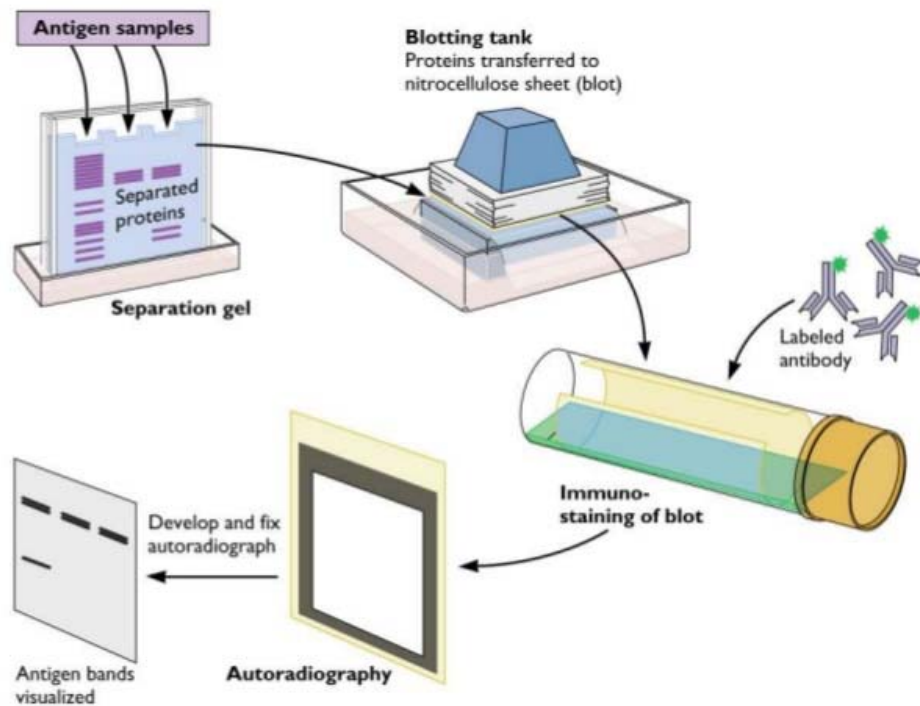


Figura 5.1: Esquema representativo de los diferentes pasos para la realización de un *Western Blot*. Fuente: <https://es.slideshare.net/tratamiento1/fundamento-y-procedimiento-de-las-pruebas-de-western-blot>

En un segundo tiempo, para que los anticuerpos puedan acceder a dichas proteínas, éstas se transfieren desde el gel desnaturalizante a una membrana adsorbente de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) por vacío, difusión o electrotransferencia.

Posteriormente se bloquean los lugares de unión de la membrana (uniones inespecíficas a proteínas) que se encuentran libres tras la transferencia, para evitar que los anticuerpos añadidos se unan a los mismos y se produzcan falsos positivos.

Tras el bloqueo, se impregna la membrana con anticuerpos específicos para las proteínas que queremos detectar y dichos complejos antígeno-anticuerpo formados son detectados mediante diferentes métodos (fluorescencia, radioactividad, actividad enzimática...). De este modo se puede analizar la presencia de una proteína específica en la muestra y cuantificar la expresión de cada una de ellas respecto a las otras proteínas del extracto.

5.3.1. Material empleado

- Muestras arteriales homogeneizadas de aorta aneurismática y controles de aorta sana.
- Tampón de homogenización
- Tampón de desnaturalización *Laemmli*.
- Tampón de transferencia
- Gel de poliacrilamida desnaturalizante *SDS-PAGE* al 10%.
- Seroalbúmina bovina (BSA) al 5%
- PBS (Phosphate-buffered saline) para lavado
- *Kit Pierce® BCA Protein Assay*
- Membrana de nitrocelulosa (*Inmobilon-P®*)
- Papel de filtro.
- Tampón de bloqueo TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*).

- Anticuerpos primarios monoclonales:
 - Subunidad gp-47 phox de la NADPH oxidasa citosólica (*Sc-14015, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*).
 - Subunidad gp-67 phox de la NADPH oxidasa citosólica (*Sc-7663, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*).
 - Subunidad gp-91 phox de la NADPH oxidasa mitocondrial (*Sc-5827, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*).
 - Óxido nítrico sintasa 2 (*Sc-8310, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA*).
 - Anticuerpo anti- β -actina (*A-5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) como control de carga.
- Anticuerpos primarios policlonales:
 - FXa (*12255-05021, AssayPro, St Charles, MO, USA*)
 - MMP-9 (*Sc-6840, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA*).
- Anticuerpos secundarios:
 - Anti-Ig G de conejo (*General Electric Healthcare, Chicago, IL; USA*) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) para la gp47-phox y el FXa
 - Anti-Ig G de cabra (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA*) conjugado con HRP para las subunidades gp91-phox y gp67-phox de la NADPH oxidasa y MMP-9.
 - Anti-Ig G de ratón (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA*) conjugado con HRP para la β -actina.

- Kit ECL plus (*Amersham Biosciences, Upp, Sweden. cod. RPN 2132*)
- Marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*)

5.3.2. Preparación de las muestras

5.3.2.1. Homogeneización de las muestras

Los explantes aórticos fueron homogeneizados mediante una unidad de dispersión de alto rendimiento *Ultra-Turrax T8®* (IKA-Werke; GmbH & Co, Staufen, Alemania) en un tampón que contenía 8 mol/L de urea, 2% de CHAPS w/v y 40 mmol/L de ditiotreitól (159). Tras esto, las muestras aórticas homogeneizadas se centrifugaron a 12.000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante.

5.3.2.2. Cuantificación de proteínas

Para poder comparar la expresión de una determinada proteína entre muestras diferentes mediante *Western Blot*, es imprescindible que la cantidad total de proteína a estudiar en cada una de ellas sea idéntica. Por ello se necesita conocer previamente la concentración de proteínas presente en cada muestra.

Para realizar esta estimación de la concentración de proteínas en las muestras, se utilizó el kit *Pierce® BCA Protein Assay* (*Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA*). Este kit utiliza el ácido biciconínico (BCA) para la detección colorimétrica y cuantificación de proteínas totales. Esta cuantificación se lleva a cabo analizando la reducción de Cu^{2+} por las proteínas, ya que el BCA se une al Cu^+ formando un complejo de color azul púrpura que puede ser detectado por colorimetría. La concentración proteica de la muestra se

determina en comparación a una proteína de referencia estándar, que en este caso es la seroalbúmina bovina.

5.3.3. Desnaturalización de proteínas y electroforesis en gel

Tras la homogeneización de la muestra y la cuantificación proteica, éstas se solubilizaron en el tampón Laemmli. La formulación de este tampón está diseñada para la electroforesis de muestras en geles de poliacrilamida, presenta un pH de 6,8 y su composición es la siguiente:

- Glicerol..... 20%
- 2-mercaptoetanol 10%
- SDS (Dodecilsulfato sódico) 4%
- Azul de bromofenol 0,004%
- M Tris-HCl 125 mM

El glicerol aporta densidad a la muestra, de modo que las proteínas se disponen en el fondo del pocillo tras la carga y se minimiza así su pérdida durante el proceso.

El 2-mercaptoetanol ayuda a separar las proteínas y a desnaturalizarlas al reducir los enlaces disulfuro existentes entre las mismas y dentro de la propia proteína.

El SDS hace que todas las proteínas adquieran la misma carga negativa y las desnaturaliza, por lo que la migración proteica en la electroforesis no se ve influida por la carga eléctrica o la estructura tridimensional de las mismas, realizándose la separación únicamente en función de su peso molecular.

La zona que más avanza durante la electroforesis en el gel, se tiñe con el azul de bromofenol, para poder conocer la posición de las proteínas y determinar el momento de detención de la electroforesis.

Por último, el M Tris-HCl, abreviatura de tris(hidroximetil)aminometano $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, se utiliza para mantener el pH en un rango que simule las condiciones fisiológicas humanas.

La electroforesis de proteínas se realizó añadiendo una cantidad igual de proteínas (40 $\mu\text{g}/\text{carril}$) de cada explante aórtico en gel de poliacrilamida desnaturalizante con dodecilsulfato sódico SDS-PAGE 10% (w/v). Para tener una referencia del peso molecular, se cargaron en uno de los pocillos marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich*, St. Louis, MI, USA)

5.3.4. Transferencia de proteínas y bloqueo

Tras realizar la electroforesis, las proteínas separadas en los geles SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Inmobilon-P®*) aplicando un campo eléctrico perpendicular al gel mediante un método de electrotransferencia semihúmeda.

La transferencia o *blotting* inmoviliza las proteínas en esta membrana sintética mediante aplicación directa, electroforesis, presión o aspiración. Esta membrana presenta ventajas para el procesamiento respecto al gel: consigue una mayor velocidad de tinción y lavado, concentra las proteínas en superficie facilitando la identificación de cantidades menores

de las mismas al no repartirse en todo el espesor del gel y resulta más sencilla de manejar, permitiendo la incubación con anticuerpos.

La membrana *Immobilion-P*® utilizada tiene una estructura de poro abierto y presenta una gran adsorción de proteínas, facilitando el acceso a las proteínas unidas y evitando la pérdida de las mismas durante la transferencia.

Para realizar este proceso, se posicionó el gel sobre dicha membrana, colocando estos entre papel de filtro en el *Trans-blot* semiseco. Posteriormente, se añadió el tampón de transferencia con la siguiente composición:

- Tris 25 mM
- Glicina 250 mM
- Metanol 15% 75 mL
- H₂O..... hasta completar 500 mL

Se aplicó una corriente de 20 V perpendicular a la membrana y al gel durante 45-60 minutos, dependiendo del peso molecular de la proteína estudiada. A continuación, fueron lavadas con metanol y PBS (tampón neutro) y se depositaron sobre papel de filtro.

La membrana de nitrocelulosa presenta una unión inespecífica a proteínas, por lo que se han de eliminar todos los lugares de unión que han quedado libres tras la transferencia mediante saturación de los mismos, evitando así que los anticuerpos se unan a la membrana y obtengamos falsos positivos. Este proceso de bloqueo se realiza incubando

la membrana a 4°C durante toda una noche con 5% (w/v) de seroalbúmina bovina disuelta al 5% en el tampón de bloqueo (TBS-T: *Tris-Buffered Saline Tween-20*).

El TBS-T utilizado presenta la siguiente composición:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l
- NaCl.....137 mmol/l
- Tween-20.....0,1%

Como se ha indicado previamente, el Tris mantiene el pH en el rango deseado. En este caso, al añadirle el ácido clorhídrico, se ajusta dicho pH a 5.2.

El Tween-20 o monooleato de Polioxietileno Sorbitan, es un surfactante polisorbato muy estable que se usa como detergente y emulsionante para evitar las uniones inespecíficas de anticuerpos.

5.3.5. Marcaje de las proteínas

Tras el bloqueo, las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante 12 horas a 4°C con anticuerpos monoclonales primarios contra las subunidades de NADPH oxidasa citosólica, gp-47 phox (Sc-14015, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz, CA, USA; dilución 1:1500) y gp-67 phox (Sc-7663, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz, CA, USA; dilución 1:1500), la subunidad gp-91 phox de la NADPH oxidasa mitocondrial (Sc-5827, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz, CA, USA; dilución 1:1500) y la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2, Sc-8310, *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz, CA, USA; dilución 1:1000). También se utilizaron anticuerpos policlonales contra el FXa

(12255-05021, *AssayPro*, St Charles, MO, USA; dilución 1:1000) y MMP-9 (Sc-6840, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*, CA; dilución 1:1000). La nitrocelulosa se incubó también con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina (A-5441, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA, dilución 1:1500) utilizado como control de carga. Tras la incubación, se procedió a lavar las membranas con PBS al 5% (tres lavados de 5 minutos cada uno) a fin de eliminar los anticuerpos primarios que no se hubieran unido a las proteínas de manera específica.

Posteriormente se incubaron las muestras durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios que reconocían una región concreta de los primarios previamente utilizados. Para ello se utilizó un anticuerpo anti-Ig G de conejo (*General Electric Healthcare*, Chicago, IL; USA; dilución 1:2500) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) para la gp47-phox y el FXa, un anticuerpo anti-Ig G de cabra (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, CA, USA, dilución 1:2000) conjugado con HRP para las subunidades gp91-phox y gp67-phox de la NADPH oxidasa y para MMP-9 y un anticuerpo anti-Ig G de ratón (*Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, CA, USA, dilución 1:7500) conjugado con HRP para la β -actina.

5.3.6. Análisis

Para obtener los niveles de expresión de cada proteína se revelaron las membranas de nitrocelulosa utilizando reactivos quimioluminescentes con el kit ECL; (*GE Healthcare*, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). En este kit, la peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con los anticuerpos secundarios transforma el sustrato Lumigen PS-3 en un éster de acridinio al ser incubadas las muestras con él. Esta reacción en condiciones

alcalinas emite una luz con una longitud de onda de 428 nm, alcanzándose un máximo de intensidad de emisión a los 15-20 minutos del inicio de la reacción.

Esta señal fue detectada utilizando un transiluminador (*Gel Logic 440 imaging system*, Kodak, USA) y la imagen obtenida se analizó por densitometría para determinar la cantidad relativa de proteína. Para ello se utilizó el software *Quantity One* (Bio-Rad, Hercules, CAL, USA) que cuantifica la densidad óptica (expresada en unidades arbitrarias) en la imagen obtenida.

5.4. ANÁLISIS POR ELISA

La liberación de IL-6 e IL-10 de los explantes aórticos, así como su contenido en trombina fueron analizados en el sobrenadante mediante ELISA (siglas en inglés de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas). Se tomó el contenido en trombina en los explantes aórticos como medida de la actividad del FXa.

Esta técnica inmunoquímica permite la detección de un ligando, normalmente una proteína, en una muestra líquida utilizando anticuerpos dirigidos contra el mismo.

Para ello, se fijan los antígenos a la superficie de unos pocillos tratados que presentan gran afinidad por las proteínas (unión directa) o a través de anticuerpos específicos dirigidos contra esos antígenos que previamente han sido fijados a su superficie (técnica *sandwich*).

A continuación, se agregan anticuerpos específicos para el ligando a estudiar, que se unen firmemente al mismo. En el ensayo de ELISA directo, los anticuerpos están conjugados

con una enzima capaz de catalizar una reacción que genera una señal detectable (en la mayoría de los casos mediante espectrofotometría). En el ELISA indirecto, el anticuerpo primario añadido no está conjugado con la enzima, por lo que hay que añadir un anticuerpo secundario conjugado con ésta, dirigido contra el anticuerpo primario. El ELISA indirecto presenta una mayor sensibilidad que el directo, al poder amplificarse la señal mediante la unión de más de un anticuerpo secundario al anticuerpo primario.

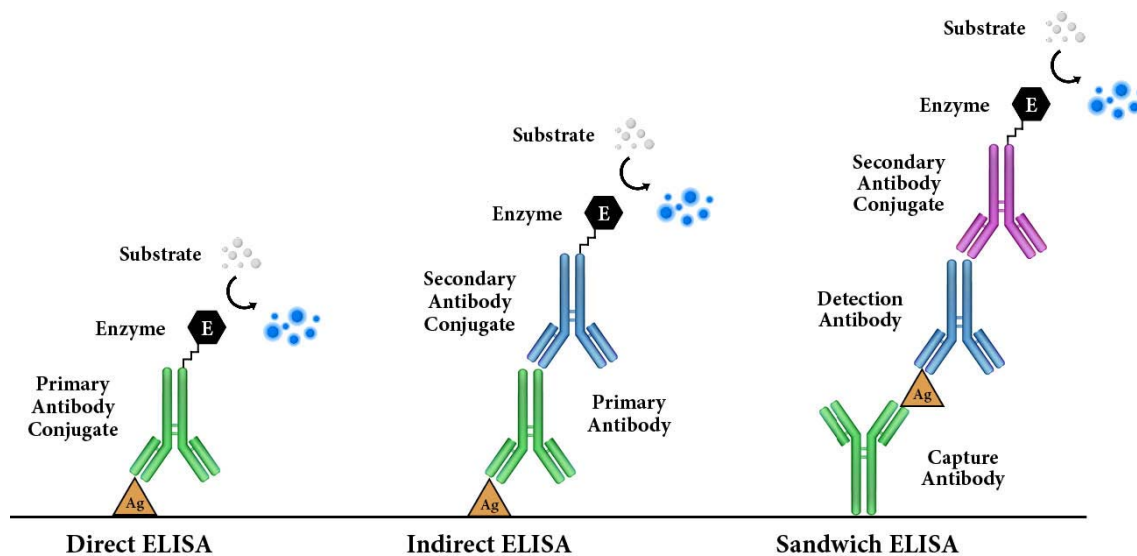


Figura 5.2: Esquema de los diferentes tipos de análisis por ELISA. *Fuente:* <https://www.aatbio.com/catalog/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa-direct-indirect-and-sandwich-assays>

5.4.1. Material utilizado

- Sobrenadante de muestras arteriales homogeneizadas de aorta aneurismática y controles de aorta sana.
- Kits comerciales de ELISA:

- Quantikine ELISA Human IL-6. D6050; (*R and D systems*, Abingdon, UK): sensibilidad 0.70 pg/mL; coeficiente de variación intraensayo 1,7-4,4%; coeficiente de variación interensayo 2,0-3,7%.
- Quantikine ELISA Human IL-10. D1000B; (*R and D systems*, Abingdon, UK): sensibilidad 3,9 pg/mL; coeficiente de variación intraensayo 2,5-6,6%; coeficiente de variación interensayo 5,6-7,6%.
- Human thrombin ELISA kit [Factor II]. ab108909; (*Abcam*, Cambridge, UK): sensibilidad 3 ng/mL; coeficiente de variación intraensayo 4,7%; coeficiente de variación interensayo 7,2%.

5.4.2. Preparación de las muestras y análisis

Tras homogeneizar las muestras según la técnica explicada en el apartado **5.3.2.1 Homogeneización de las muestras**, se realizó la determinación de IL-6, IL-10 y trombina mediante los kits comerciales de ELISA previamente descritos, según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Todas las muestras fueron analizadas con el mismo kit de ELISA y en todos los casos se realizó una técnica de ELISA directo en sándwich, de modo que el antígeno a estudiar se fija a un anticuerpo específico que se encuentra en los pocillos y el anticuerpo primario añadido tiene conjugada la enzima catalizadora, que en este estudio fue la peroxidasa de rábano. Esta enzima es capaz de catalizar el sustrato presente en el kit (la tetrametilbenzidina, que presenta un color amarillo), transformándola en tetrametilbenzidina dimina, que tiñe el pocillo de color azul característico. La cantidad de tetrametilbenzidina transformada es directamente proporcional a la concentración de

antígeno presente en el pocillo. Tras finalizar la reacción, el pocillo recupera su color amarillo previo. No obstante, la cantidad de tetrametilbenzidina que ha sido transformada, puede ser cuantificada mediante espectrofotometría con una longitud de onda de 450 nm que detecta la luz de color azul que ha sido emitida por el sustrato durante la reacción.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados en cuanto a características clínicas y curva dosis-respuesta del rivaroxabán se expresan como media \pm error estándar de la media. Los valores de expresión proteica no presentaron una distribución normal por lo que se presentan como mediana y percentiles 25 y 75. Las concentraciones de distintas moléculas se expresaron en unidades arbitrarias (UA) en el caso del *Western Blot* y en unidades del sistema internacional en los test de ELISA.

La expresión proteica en AAA fue comparada con el control de aorta sana utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney. El test de Wilcoxon fue utilizado para comparar las muestras de AAA incubadas en presencia y en ausencia de rivaroxabán. Se utilizó el análisis de correlación de Rho-Spearman para valorar las asociaciones entre el nivel de expresión de diferentes proteínas y la expresión de MMP-9 en las muestras aneurismáticas.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el paquete informático SPSS 22.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, USA), tomando un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS

Se incluyeron en el estudio muestras de pared aórtica aneurismática de seis pacientes con AAA, así como muestras de control de seis donantes de órganos fallecidos por traumatismo craneoencefálico. Los datos demográficos, comorbilidad, características del aneurisma y tratamiento concomitante de los pacientes y donantes incluidos se muestran en la **Tabla 6.1**. Como era de esperar, los pacientes con AAA presentaron mayor edad y diámetro máximo de la aorta que los controles de donantes sanos.

Todos los AAA presentaron trombo intraluminal, que no existía en las muestras de los donantes de órganos. Sin embargo, las muestras aórticas de estos pacientes fueron lavadas exhaustivamente con suero salino durante la preparación de las mismas para el análisis subsecuente. De esta forma, el trombo fue completamente eliminado de dichas muestras y no fue procesado en el estudio posterior.

Como ya hemos indicado, los pacientes de los que se tomaron las muestras de AAA, no habían estado bajo tratamiento con anticoagulantes durante los doce días previos a la cirugía. Desgraciadamente, no fue posible analizar si alguno de los donantes de control se encontraba bajo tratamiento farmacológico, debido a que el proceso de donación es completamente anónimo y todos los datos clínicos están protegidos. No obstante, ha de tenerse en cuenta, que los datos moleculares de las muestras aórticas de los donantes se utilizaron únicamente como una aproximación de los valores normales.

Tabla 6.1: Datos demográficos, comorbilidad, características del aneurisma y tratamiento concomitante de los pacientes y donantes incluidos.

PARAMETROS	CONTROL (N=6)	AAA (N=6)	P
Edad (Años)	43,50 ± 2,43	70,00 ± 1,97	0,004
Varón/Mujer	6/0	6/0	-
Diámetro de la aorta (mm)	16,83 ± 0,48	61,00 ± 7,42	0,004
Presencia de trombo mural	0/6	6/6	-
<i>FACTORES DE RIESGO</i>			
Tabaco	-	2/6	-
Hipertensión	-	6/6	-
Hipercolesterolemia	-	6/6	-
Diabetes Mellitus	-	1/6	-
<i>TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO</i>			
ARA-II	-	3/6	-
IECA	-	1/6	-
Beta-bloqueantes	-	2/6	-
Estatina	-	5/6	-

Edad y diámetro aórtico presentados como media ± error estándar de la media. ARA-II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II. IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

6.2. NIVELES DE FXa EN LAS MUESTRAS E INHIBICIÓN POR RIVAROXABÁN

En primer lugar, se analizó el nivel de FXa contenido en las muestras de AAA. Tal y como muestra la **Figura 6.1**, el nivel de expresión del FXa en las muestras de AAA (10038 UA) fue mucho mayor que en los explantes aórticos de los controles (522 UA).

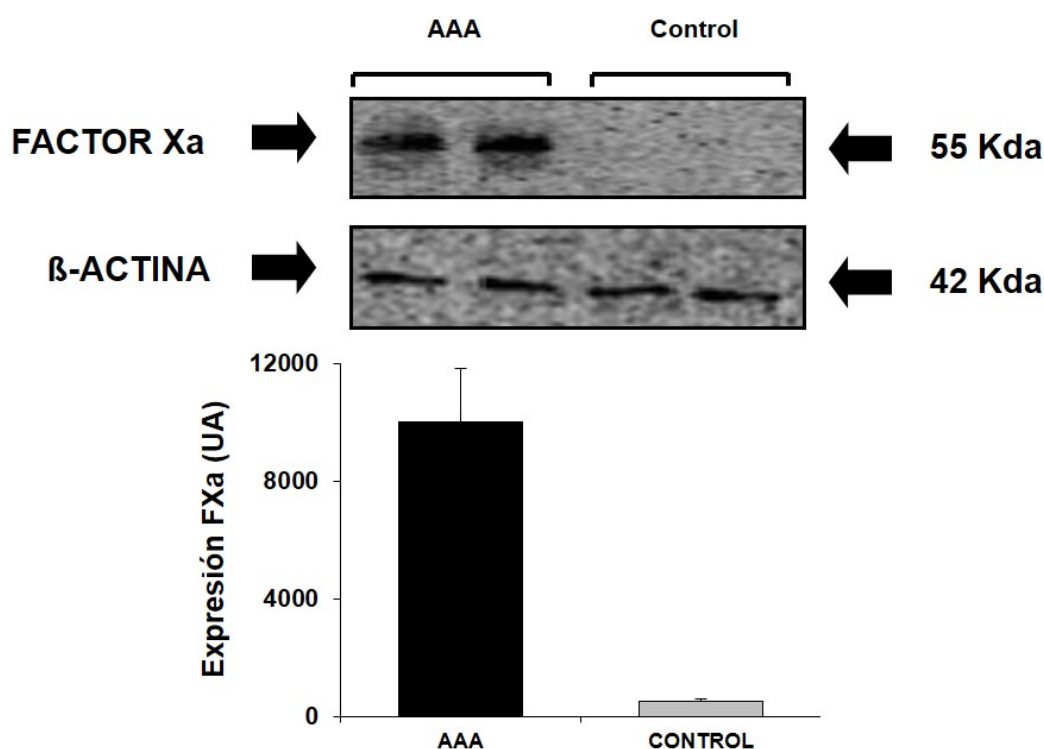


Figura 6.1: *Western blot* mostrando la expresión de FXa en dos controles y dos muestras de aneurisma de aorta abdominal. *La expresión de β-actina fue utilizada como control.*
UA: Unidades Arbitrarias

Como se indicó previamente, para determinar la concentración de rivaroxabán a utilizar para los experimentos *in vitro*, se realizó una curva de concentración-respuesta, estudiando si concentraciones incrementales de rivaroxabán eran capaces de inhibir el

contenido en trombina del AAA. Tal y como se observa en la **Figura 6.2**, 5×10^{-10} mol/L de rivaroxabán redujeron significativamente el contenido en trombina del AAA, mientras que 5×10^{-8} mol/L de rivaroxabán inhibían completamente el contenido en trombina del AAA. Esto resultados concuerdan con los de estudios previos en los que 50 nmol/L de rivaroxabán también conseguían inhibir de forma completa la actividad del FXa (163), por lo que esta concentración fue utilizada en el resto de experimentos.

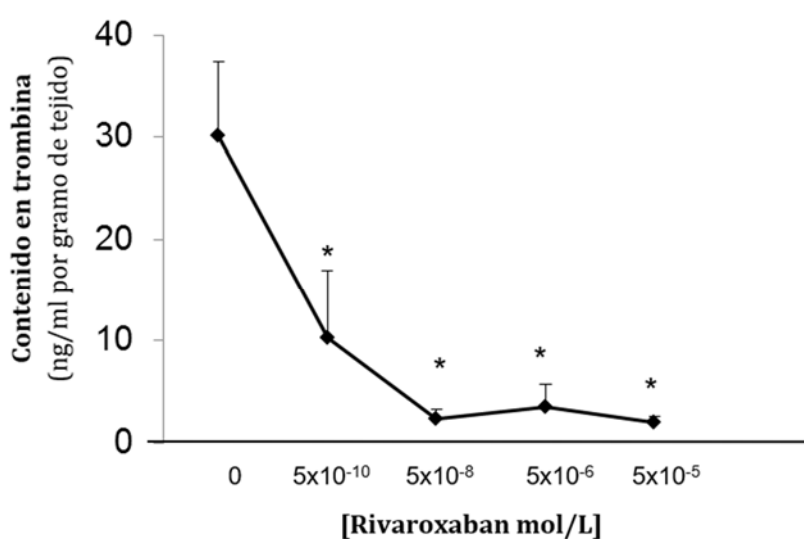


Figura 6.2: Curva dosis-respuesta del rivaroxabán en función del contenido en trombina. Los resultados se presentan como *media* \pm *error estándar de la media*. * $p < 0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

6.3. BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN

Como puede verse en la **Figura 6.3**, los niveles de la interleuquina proinflamatoria IL-6 hallados mediante ELISA en el sobrenadante de las muestras de AAA fueron significativamente mayores que en el de los explantes aórticos de donantes de órganos utilizados como control (mediana 135,07 vs 23,45 pg/ml por mg de tejido, $p=0,002$).

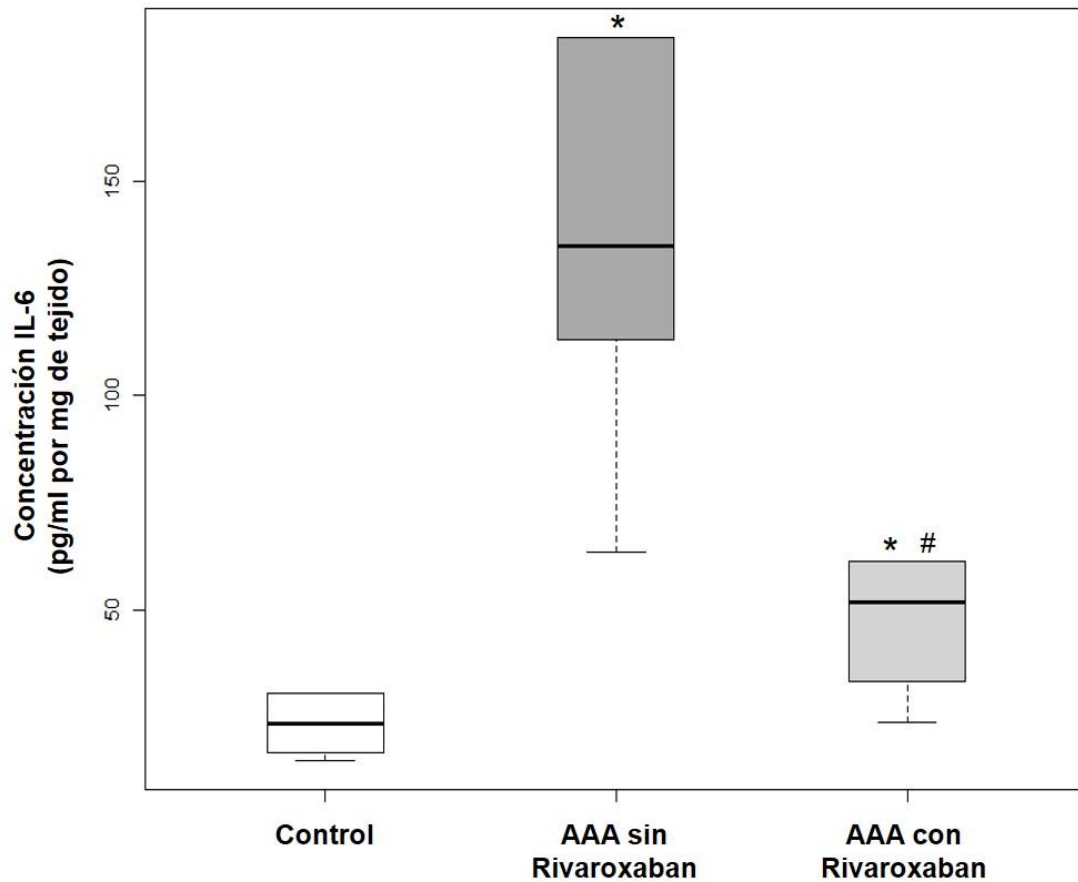


Figura 6.3: Niveles de IL-6 en el sobrenadante de las muestras. * $p < 0,05$ respecto al control de aorta sana. # $p < 0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

La incubación con rivaroxabán de las muestras de AAA redujo significativamente la liberación de IL-6 de las mismas (mediana 51,61 vs 135,07 pg/ml por mg de tejido, $p = 0,028$), aunque se mantuvo leve pero significativamente mayor que en los controles (mediana 51,61 vs 23,45 pg/ml por mg de tejido, $p = 0,041$).

Los niveles de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 fueron similares en el sobrenadante de las muestras de AAA y los controles (mediana 19,91 vs 18,29 pg/ml por mg de tejido, $p=0,394$).

Sin embargo, como se puede ver en la **Figura 6.4**, las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán presentaron un marcado incremento de liberación de IL-10 que fue significativamente mayor que en los controles (mediana 116,87 vs 18,29 pg/ml por mg de tejido, $p=0,002$) y que en las muestras de AAA incubadas sin rivaroxabán (mediana 116,87 vs 19,91 pg/ml por mg de tejido, $p=0,028$).

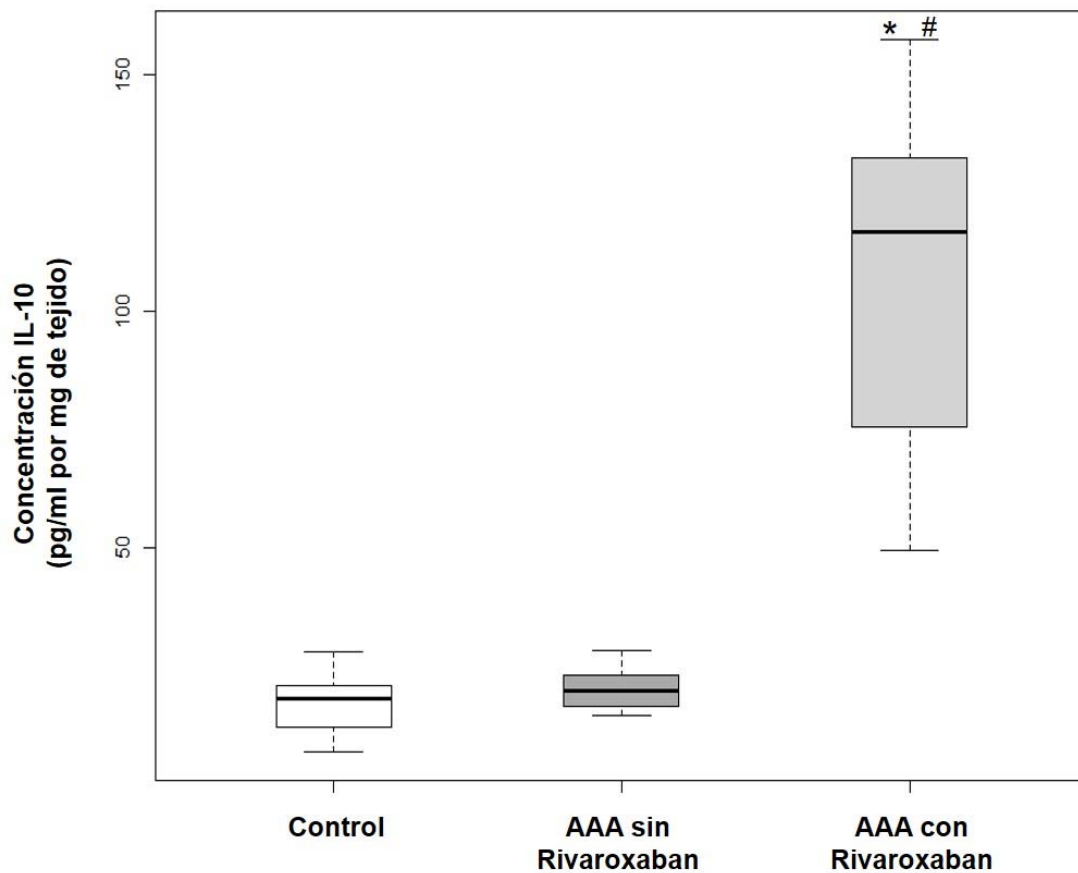


Figura 6.4: Niveles de IL-10 en el sobrenadante de las muestras. $*p<0,05$ respecto al control de aorta sana. $\#p<0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

Estos datos apuntan a un estado proinflamatorio de los AAA y a un efecto antiinflamatorio del rivaroxabán, que pudo ser confirmado mediante la ratio proinflamatoria IL-6/IL-10.

Esta ratio fue significativamente mayor en las muestras de AAA que en los controles (mediana 7,2 vs 1,51, $p=0,004$). La incubación de AAA en presencia de rivaroxabán redujo significativamente la ratio IL-6/IL-10 con respecto a las muestras de AAA incubadas sin el fármaco (mediana 0,52 vs 7,2, $p=0,028$) e incluso respecto a los controles (mediana 0,52 vs 1,51, $p=0,015$) tal y como muestra la **Figura 6.5**.

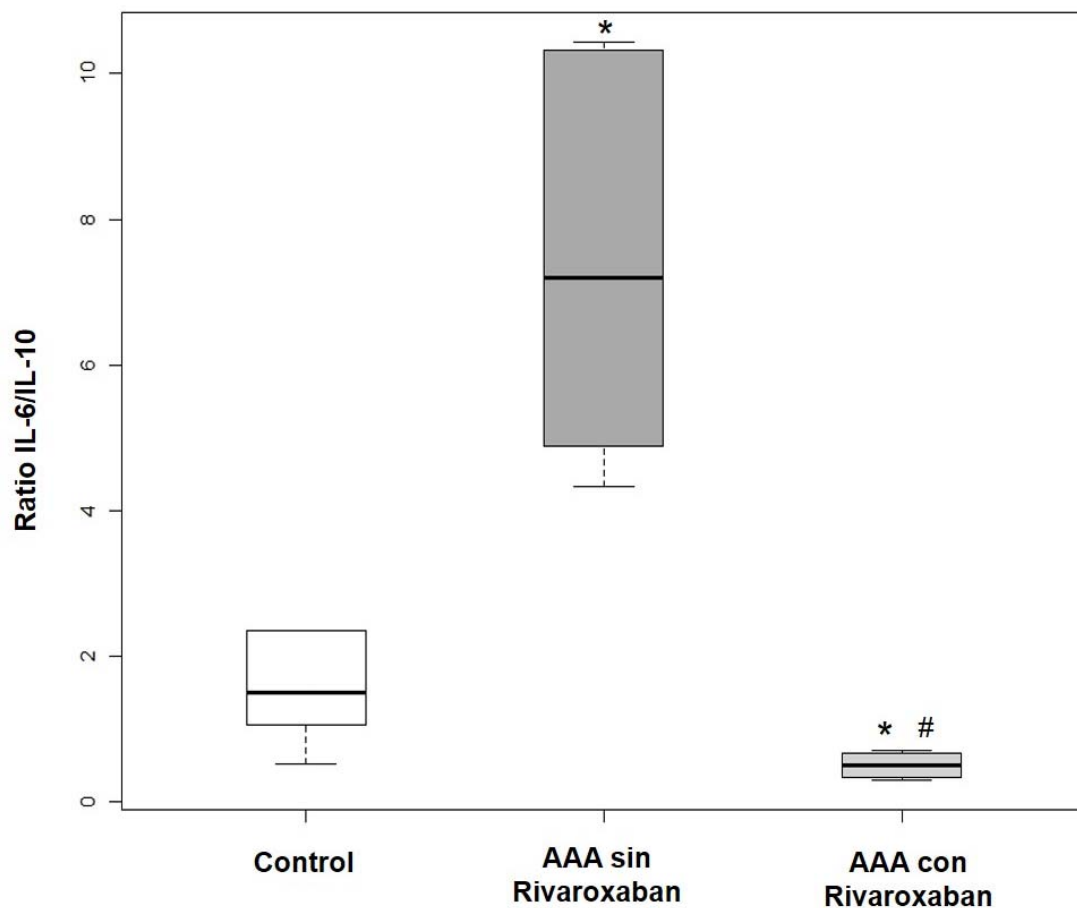


Figura 6.5: Ratio IL-6/IL-10 en el sobrenadante de las muestras. * $p<0,05$ respecto al control de aorta sana. # $p<0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

El nivel de expresión proteica de la forma inducible de NOS, la isoforma NOS2, también fue analizado mediante *Western Blot* siguiendo la técnica explicada previamente en el apartado de material y métodos. Tal y como se muestra en la **Figura 6.6**, la expresión de NOS2 fue significativamente mayor en las muestras de aneurisma que en los controles (mediana 3842 vs 1060 UA, $p=0,009$).

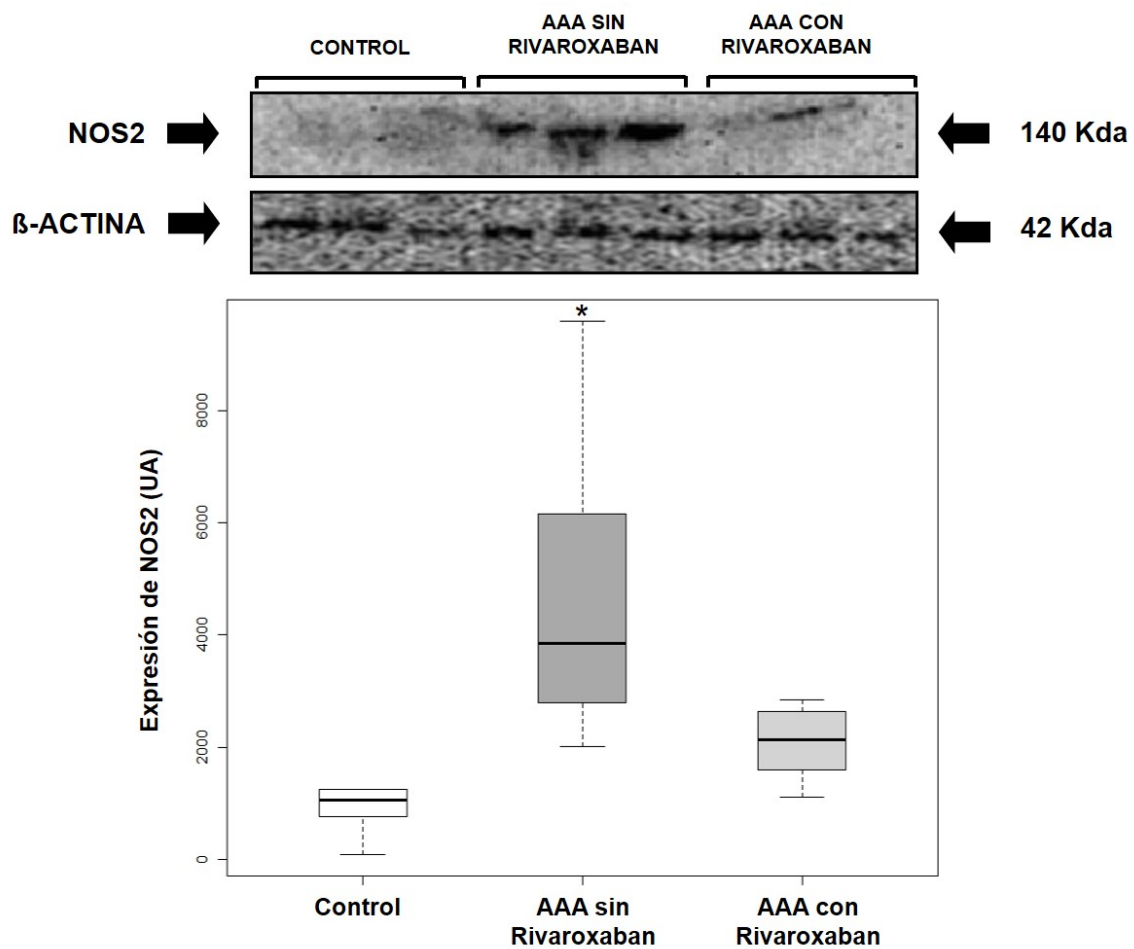


Figura 6.6: *Western blot* mostrando la expresión de NOS2. La expresión de β -actina fue utilizada como control. UA: Unidades Arbitrarias. $*p<0,05$ respecto al control de aorta sana.

Los niveles de expresión de NOS2 tendieron a disminuir en las muestras de AAA incubadas con rivaroxabán en comparación con aquellas muestras incubadas sin el fármaco (mediana 2140,5 vs 3842 UA, $p=0,075$). De hecho, como se observa en la **Figura 6.6**, el nivel de expresión de NOS2 en las muestras de aneurisma incubadas con rivaroxabán fue similar al observado en las muestras de control (mediana 2140,5 vs 1060 UA, $p=0,132$).

6.4. EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE LA NADPH OXIDASA

El análisis por *Western Blot* mostró (**Figuras 6.7 y 6.8**) que el nivel de expresión de las subunidades gp67-phox de la NADPH oxidasa citosólica y gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial fue significativamente mayor en las muestras de AAA que en los controles: mediana 8002 vs 2358,5 UA, $p=0,009$ para la gp67-phox y 3971,5 vs 1493 UA, $p=0,002$ para la gp91-phox.

Como podemos observar en las mismas figuras, en las muestras de AAA, la incubación en presencia de rivaroxabán redujo significativamente los niveles de expresión tanto de gp67-phox como de gp91-phox con respecto a las muestras sin el fármaco (mediana 2296,5 vs 8002 UA, $p=0,028$ para la gp67-phox y 2022,5 vs 3971,5 UA, $p=0,028$ para la gp91-phox). De hecho, la expresión de estas subunidades de la NADPH oxidasa, disminuyó hasta alcanzar incluso niveles similares a los que fueron observados en los controles (mediana 2296,5 vs 2358,5 UA, $p=1$ para la gp67-phox y 2022,5 vs 1493 UA, $p=0,31$ para la gp91-phox).

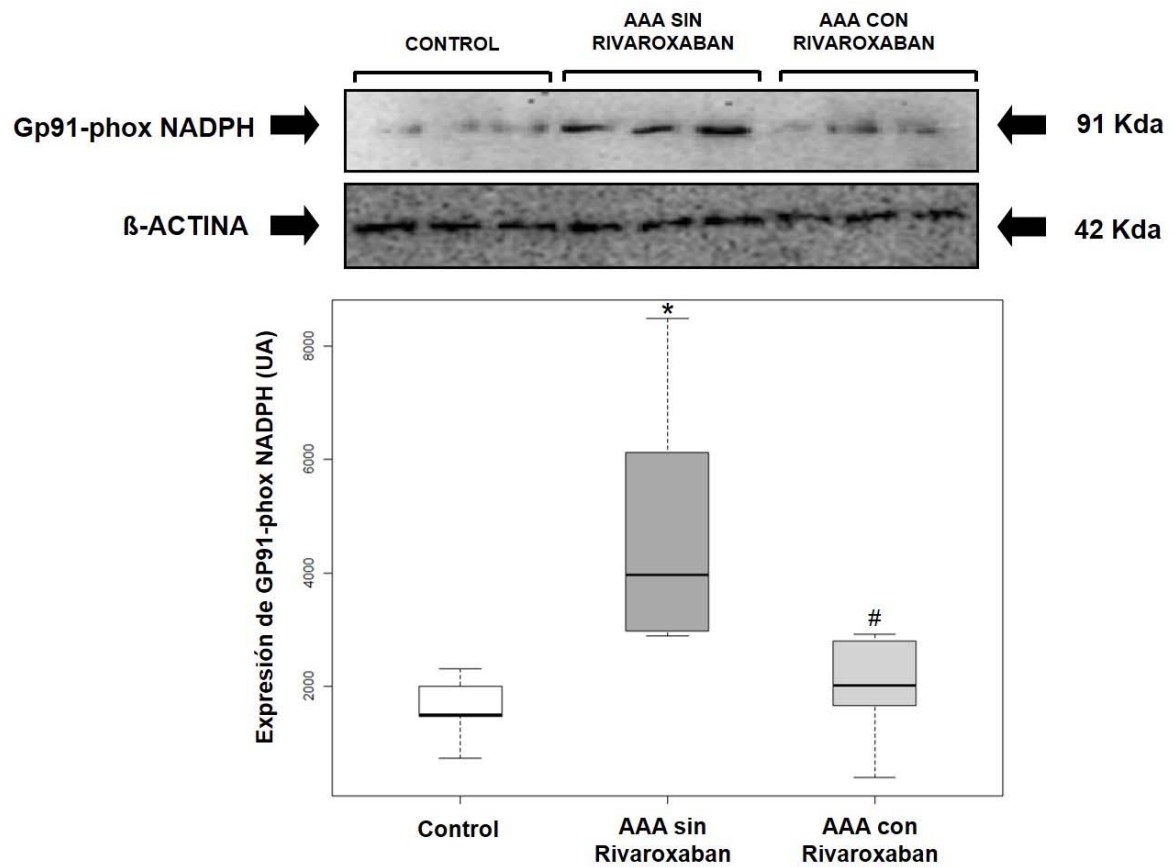


Figura 6.7: *Western blot* mostrando la expresión de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial. La expresión de β -actina fue utilizada como control. UA: Unidades Arbitrarias. * $p < 0,05$ respecto al control de aorta sana. # $p < 0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

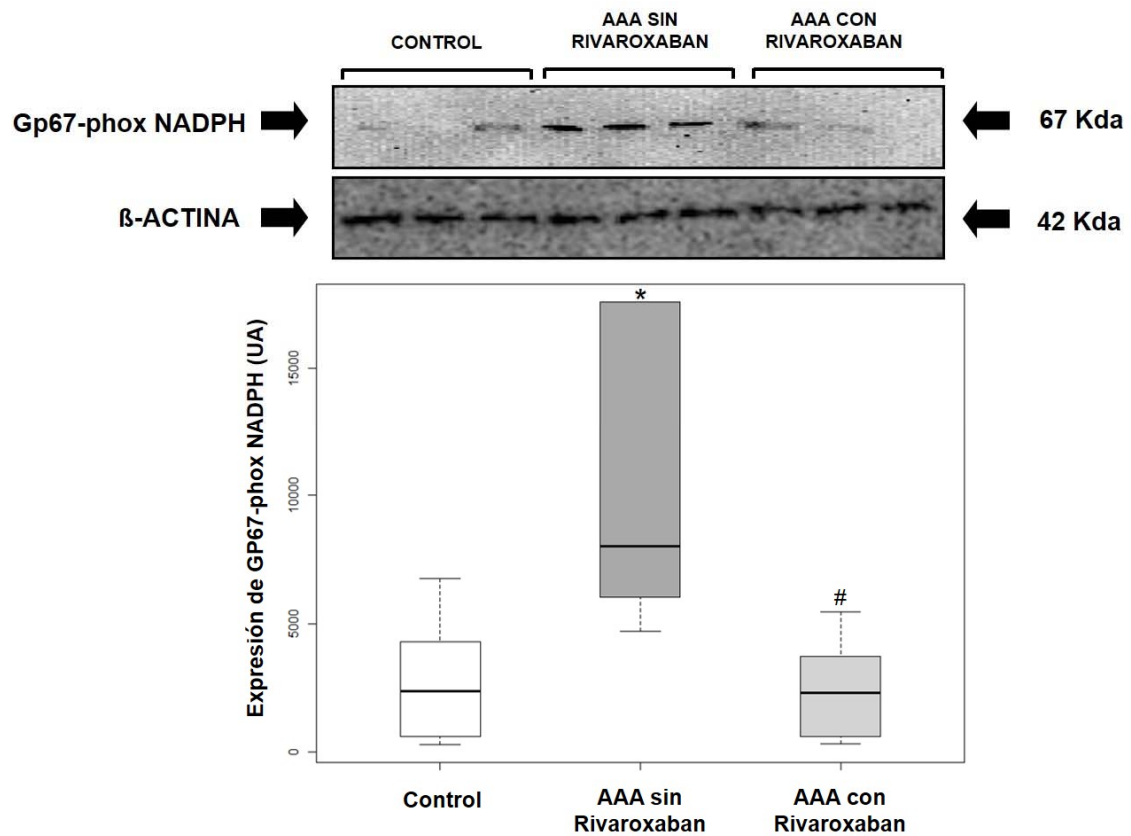


Figura 6.8: *Western blot* mostrando la expresión de la subunidad gp67-phox de la NADPH oxidasa citosólica. La expresión de β -actina fue utilizada como control. UA: Unidades Arbitrarias. * $p < 0,05$ respecto al control de aorta sana. # $p < 0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

También se observaron diferentes niveles expresión de la subunidad gp47-phox de la NADPH oxidasa citosólica entre los tres grupos experimentales en el mismo sentido que en las otras dos subunidades (**Figura 6.9**). No obstante, estas diferencias no alcanzaron significación estadística en nuestras muestras para esta subunidad (AAA sin rivaroxabán vs control: mediana 3114 vs 1904 UA, $p=0,329$; AAA con rivaroxabán vs sin rivaroxabán: mediana 2763,5 vs 3114 UA, $p=0,893$; AAA con rivaroxabán vs control: mediana 2763,5 vs 1904 UA, $p=0,485$)

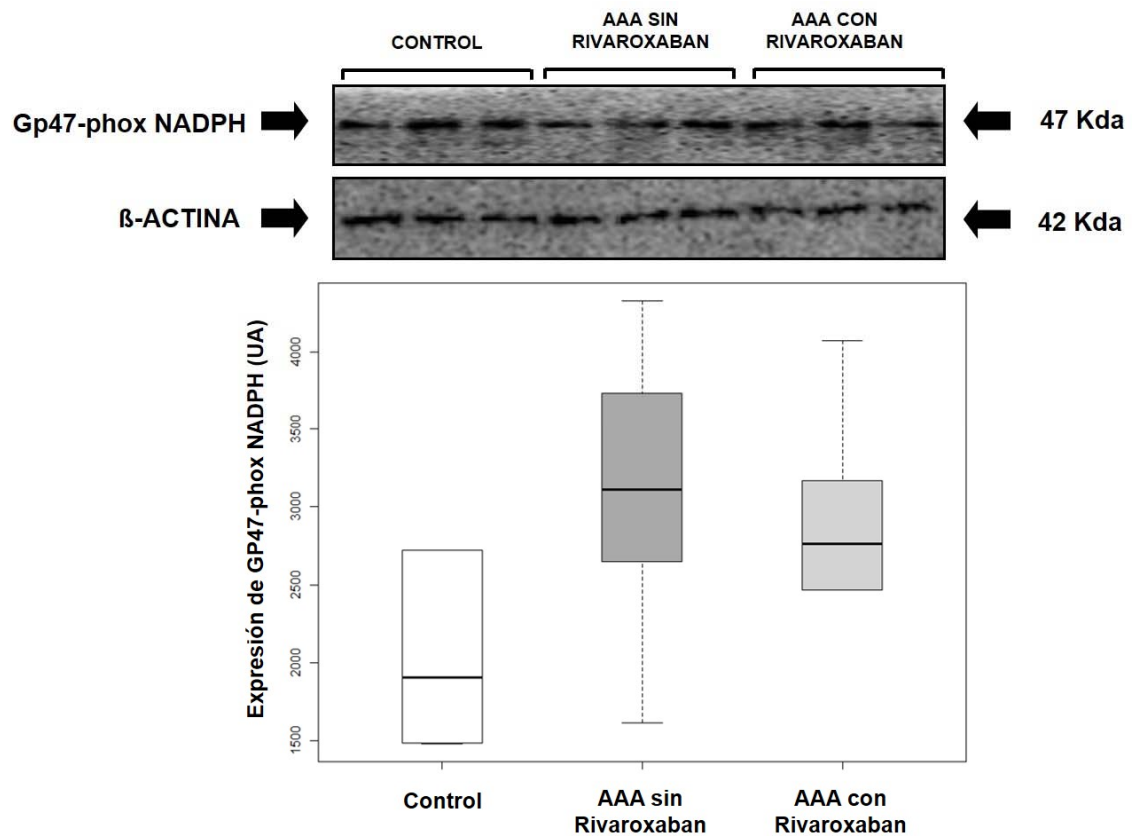


Figura 6.9: *Western blot* mostrando la expresión de la subunidad gp47-phox de la NADPH oxidasa citosólica. La expresión de β -actina fue utilizada como control. UA: Unidades Arbitrarias.

6.5. NIVELES DE MMP-9 Y SU ASOCIACIÓN CON PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO

Como se puede observar en la **Figura 6.10**, las muestras de AAA expresaron niveles más altos de MMP-9 que los controles de aorta abdominal sana (mediana 6487,5 vs 2581 UA, $p=0,002$).

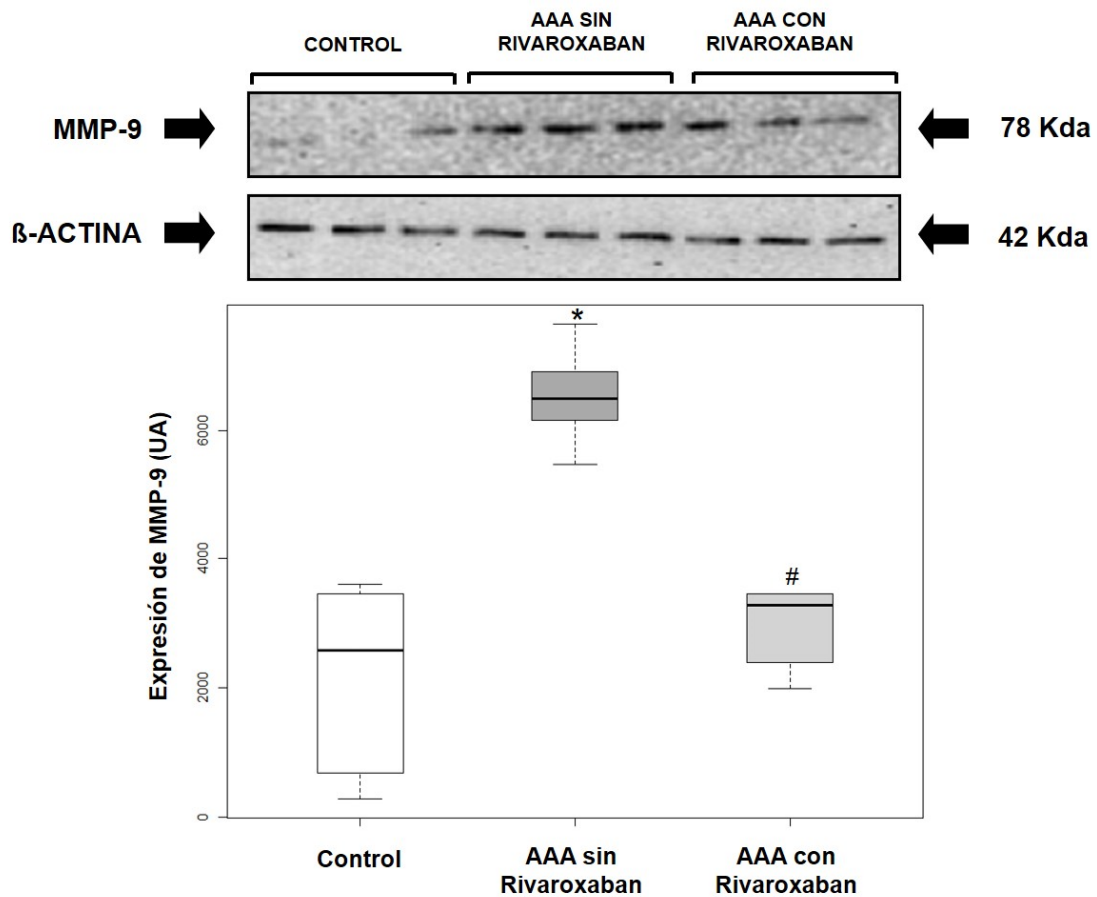


Figura 6.10: *Western blot* mostrando la expresión de MMP-9. La expresión de β -actina fue utilizada como control. UA: Unidades Arbitrarias. * $p < 0,05$ respecto al control de aorta sana. # $p < 0,05$ respecto a AAA sin rivaroxabán.

La adición del rivaroxabán al cultivo de AAA también redujo significativamente la expresión de MMP-9 en los AAA respecto a las muestras sin fármaco (mediana 3278 vs 6487,5 UA, $p = 0,043$) hasta niveles similares a los encontrados en las aortas de control (mediana 3278 vs 2581 UA, $p = 0,662$).

El análisis de correlación de Spearman, reveló que los niveles de expresión de MMP-9 en los explantes aórticos se relacionaron directamente con los niveles de expresión de NOS2, y de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa (**Tabla 6.2**). Además, como se observa en dicha tabla, los niveles de MMP-9 también se relacionaron directamente con los niveles de IL-6 en el sobrenadante de los explantes aórticos y la ratio IL-6/IL-10.

La asociación entre la subunidad gp67-phox de la NADPH oxidasa y MMP-9 no alcanzó significación estadística en las muestras estudiadas, aunque si se observó la misma tendencia que en la subunidad gp-91phox con un valor de $p=0,061$. No se encontró ninguna relación entre los niveles de expresión de MMP-9 en las muestras y los niveles de IL-10 en el sobrenadante o la expresión de la subunidad gp47-phox de la NADPH oxidasa.

Tabla 6.2: Correlación de Spearman entre la expresión de MMP-9 y parámetros inflamatorios y de estrés oxidativo.

<i>Variables</i>	Expresión de MMP-9	
	<i>Coefficiente de Rho Spearman</i>	<i>P</i>
Concentración de IL-6	0,794	< 0,001
Concentración de IL-10	-0,049	0,852
Ratio IL-6 / IL-10	0,642	0,005
Expresión de NOS2	0,642	0,005
Expresión de Gp91-phox NADPH	0,679	0,003
Expresión de Gp67-phox NADPH	0,463	0,061
Expresión de Gp47-phox NADPH	0,015	0,957

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra por primera vez los posibles efectos del FXa endógeno presente en los AAA humanos en la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo a dicho nivel, que se han visto implicados en la formación, crecimiento y rotura de los mismos.

Además, estos datos sugieren que el rivaroxabán, un inhibidor específico de la actividad del FXa, puede revertir estos efectos relacionados con su patogenia al reducir los niveles de expresión de dos subunidades de la NADPH oxidasa y MMP-9, disminuir la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-6 y la expresión de NOS2, y aumentar la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en las muestras de AAA.

Asimismo, los niveles de algunas de estas proteínas en la pared aórtica se relacionaron directamente con el nivel de expresión de MMP-9, que está directamente implicado en la formación y crecimiento de AAA (98, 100-102).

7.1. FXA Y COAGULACIÓN EN AAA

En la mayoría de los pacientes con AAA, la pared del vaso se encuentra recubierta por trombo intraluminal que no suele impedir el flujo sanguíneo (91). Esto hace que en los pacientes con AAA se observe un estado de coagulación activada (179).

A pesar de que el papel exacto del trombo intraluminal en la aorta aneurismática aún no ha sido esclarecido, la presencia de éste se considera un factor de riesgo para la dilatación aórtica y el crecimiento y rotura de AAA (180, 181).

Este estado alterado de la coagulación en los AAA se ha relacionado con otras alteraciones cardiovasculares en estos pacientes (182, 183) y con una complicación poco frecuente pero conocida de la enfermedad aneurismática, la coagulación intravascular diseminada (CID) inducida por aneurismas que, en ocasiones, incluso precede al diagnóstico del AAA (184) y puede revertir tras la reparación quirúrgica del mismo (185). La presencia de trombo intraluminal en los AAA ha demostrado ser un factor de riesgo independiente para la aparición de esta complicación potencialmente devastadora (186). La acumulación focal de plaquetas radiomarcadas en las lesiones aneurismáticas en un 78% de pacientes, según un estudio de Sakakibara *et al.* (187), apoya la idea de que el AAA supone un foco de activación local de factores de la coagulación que puede estar relacionado con su patogenia. Además, se han publicado distintos casos en los que el tratamiento de esta patología inhibiendo el FXa mediante rivaroxabán consiguió una mejoría clínica en pacientes con CID que no estaban respondiendo a otros anticoagulantes (188, 189), e incluso en terapia a largo plazo de la CID crónica (190). Esto podría señalar un papel importante del FXa en la aparición y desarrollo de la misma en estos pacientes, así como en las alteraciones de la coagulación a nivel local que presentan los AAA.

Los resultados de este estudio son congruentes con estas características específicas de la coagulación en pacientes con aneurismas, al evidenciarse una expresión muy aumentada

de FXa en las muestras de AAA comparado con el nivel observado en explantes de aorta sana de donantes utilizados como controles.

Las implicaciones de este aumento FXa en procesos de inflamación y estrés oxidativo han sido descritos en numerosos trabajos (145, 191-194), pero hasta ahora ningún estudio ha analizado las implicaciones del mismo en aneurismas humanos.

En 2017, Moran *et al.* (150) estudiaron el efecto de la inhibición de FXa/FIIa mediante enoxaparina y la inhibición del FXa mediante fondaparinux en un modelo experimental de aneurisma aórtico usando ratones ApoE^{-/-} infundidos con AngII. En este estudio, la concentración de FXa en la aorta suprarrenal se correlacionó directamente con el diámetro aórtico a dicho nivel. La administración parenteral de enoxaparina y fondaparinux durante 14 días redujo la severidad de la enfermedad aneurismática y las lesiones ateroscleróticas en estos ratones ApoE^{-/-} infundidos con AngII, mientras que la administración enteral de dabigatrán, un inhibidor del FIIa, no tuvo un efecto significativo en los mismos, apuntando a un papel fundamental del FXa en estos procesos. Ese estudio, a su vez, intentó analizar los mecanismos por los cuales el FXa se relacionó con la aparición y progresión de aneurismas. La infusión de AngII en el modelo experimental aumentó la expresión del *protease-activated receptor-2* (PAR-2).

Estos hallazgos son consistentes con trabajos previos que demostraron un efecto celular directo del FXa en la pared vascular mediado por PAR (195-198). Los PAR (*protease-activated receptor*) son una familia de receptores acoplados a proteínas G, cuya activación

produce migración de células de músculo liso, remodelación vascular, angiogénesis e inflamación y que están implicados en la patogenia de los AAA y la aterosclerosis.

Tanto en el estudio de Moran como en un estudio previo de Borensztajn *et al.* (199) la transducción de señal producida por el FXa pudo ser inhibida mediante agonistas de PAR-2, pero no de PAR-1. Esto parece indicar que los efectos del FXa en cuanto a aparición y desarrollo de enfermedad aneurismática y aterosclerosis, son mediados por PAR-2 mediante un proceso de señalización Smad2/3 (grupo de proteínas que funcionan como segundo mensajero propagando señales intracelulares). Un estudio previo de Jobi *et al.* (145) también observó un efecto directo del FXa en la inducción de PAR-2 en células de músculo liso vascular independiente del FIIa, no encontrando relación entre FXa y PAR-1.

Aunque en el citado estudio de Moran *et al.* se encontró una disminución en el infiltrado de monocitos/macrófagos, en la degradación de las fibras de elastina y en la expresión de MMP en los ratones infundidos con fondaparinux, no se analizaron los factores relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en estas muestras, por lo que no se pudo demostrar si el efecto del FXa en la génesis de la enfermedad aneurismática estaba mediado por estos mecanismos.

El único estudio hasta la fecha que incluye la administración de rivaroxabán en un modelo experimental de aneurisma con ratones ApoE^{-/-} e infusión de AngII fue publicado en 2019 por Allen-Redpath *et al.* (151). En éste, además de resaltar la importancia de los fosfolípidos oxidados enzimáticamente procoagulantes en la formación del AAA, se

observó que entre los ratones ApoE^{-/-} a los que se les administraba rivaroxabán de forma oral, menos de un 20% desarrollaba un aneurisma aórtico tras la infusión de AngII, frente a casi el 90% de los ratones sin rivaroxabán.

El efecto de la coagulación sobre la formación de aneurismas se puso también de manifiesto en dicho estudio, al emular los efectos protectores del rivaroxabán mediante la creación de una coagulopatía de consumo inyectando fosfolípidos procoagulantes en la circulación. Este método ha demostrado previamente aumentar de forma aguda la coagulación in vivo (200), por lo que, al desviar factores de coagulación de la pared del vaso, podría disminuir también el desarrollo de AAA. Por ello es importante avanzar en el conocimiento de los puntos de unión y activación de estos factores para entender su papel en la aparición de AAA.

7.2. BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA INFLAMACIÓN EN MUESTRAS DE AAA HUMANO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LOS MISMOS

Como se ha mencionado previamente, la inflamación se ha asociado con la patogenia del AAA (201-203). Alrededor de un 5-10% de los AAA se consideran “aneurismas inflamatorios”, caracterizados por una respuesta inmune muy aumentada con infiltrado perianeurismático y fibrosis retroperitoneal (204).

Sin embargo, los mecanismos inflamatorios parecen estar implicados en la patogénesis de todos los aneurismas. De hecho, numerosos trabajos han confirmado una elevada

producción de citoquinas proinflamatorias en los AAA (116, 205, 206) que inducen el reclutamiento de células inmunes, promoviendo la destrucción de las células de la pared vascular y debilitando la misma (117). Concretamente, la IL-6 ha sido implicada específicamente en la patogénesis del aneurisma (118, 119).

Los resultados de este trabajo también refuerzan esta hipótesis al demostrarse que las muestras de AAA en nuestra serie liberaron una mayor cantidad de IL-6 que los controles. La proteína NOS2, una enzima cuya expresión ha sido asociada frecuentemente con estados inflamatorios (207, 208), también presentaba una expresión aumentada en las muestras de AAA en comparación con los controles. Este hecho concuerda con los hallazgos de Zhang *et al.*, que ya describieron previamente este aumento de la expresión de NOS2 en los AAA humanos (209).

A pesar de no conocerse aún exactamente la relación de la activación de la coagulación en los AAA con estos cambios inflamatorios relacionados con su patogenia, parece que el FXa puede ser una pieza fundamental en la interconexión de estos dos sistemas (191, 210).

Se han descrito efectos proinflamatorios del FXa en diferentes tejidos humanos, incluyendo fibroblastos, tejido auricular y cultivos de macrófagos (211-213). Como se ha indicado en el apartado anterior, esta acción del FXa en distintos procesos celulares como la inflamación, el estrés oxidativo, la fibrosis y el remodelado tisular parece llevarse a cabo a través de la activación de receptores PAR-2 (214).

El inhibidor del FXa, rivaroxabán, disminuyó la liberación de IL-6 de las muestras aneurismáticas de este estudio, así como la expresión de NOS2. Este efecto del fármaco ya había sido demostrado con anterioridad en un estudio de Zhou *et al.*, en el que se relacionó esta disminución en la liberación de IL-6 y otras citoquinas proinflamatorias con el aumento de la estabilidad de la placa aterosclerótica producida por el fármaco (215).

Distintos estudios han confirmado esta actividad antiinflamatoria del rivaroxabán en los últimos años: la inhibición del FXa mediante el fármaco ha conseguido atenuar el remodelado cardiaco mediado por inflamación en un modelo murino con hipoxia intermitente (216), así como el daño renal por hipertensión al inhibir la respuesta inflamatoria asociada en ratones (217). Dittmeier *et al.* también han demostrado que el tratamiento previo con este fármaco disminuye la severidad del ictus en ratas gracias a un mecanismo dual antitrombótico y antiinflamatorio (218). Además, coincidiendo con los resultados previos del grupo del Dr. López-Farré (149), Hara *et al.* (219) y Posthuma *et al.* (220) han descrito recientemente los efectos protectores del rivaroxabán frente a la progresión y desestabilización de lesiones ateroscleróticas al inhibir la activación proinflamatoria de los macrófagos en las mismas.

Estos efectos antiinflamatorios han sido también confirmados en humanos, donde los marcadores séricos de inflamación disminuyeron en pacientes con fibrilación auricular tras 6 meses de tratamiento con rivaroxabán (221).

Basándose en estos efectos adicionales a su actividad anticoagulante, se diseñó en 2013 el ensayo clínico COMPASS (*Cardiovascular Outcomes for People Using Anticoagulation Strategies*) que demostró que en pacientes con enfermedad arterial periférica o coronaria, la combinación de una dosis baja de rivaroxabán con aspirina resultó en una disminución de eventos adversos cardiovasculares en comparación con aquellos pacientes tratados únicamente con aspirina (222). Un estudio posterior dentro de este ensayo en pacientes con enfermedad arterial periférica o carotídea confirmó estos hallazgos y encontró también una disminución de eventos isquémicos en miembros inferiores en estos pacientes (223). Por último, los beneficios del rivaroxabán han sido demostrados también en infarto agudo de miocardio tanto en modelos murinos (224), como en humanos en el ensayo ATLAS ACS 2-TIMI 51 (225).

Diversos autores han relacionado estos efectos adicionales del rivaroxabán con su actividad antiinflamatoria y su acción sobre el endotelio y el estrés oxidativo (226, 227), por lo que resulta lógico pensar que pudiera tener efectos positivos también en otras enfermedades que comparten dichos mecanismos fisiopatogénicos como el AAA.

Por último, en este estudio no se ha encontrado una alteración en la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en las muestras de AAA respecto a los controles sanos. Esto puede sugerir una regulación diferente de IL-6 e IL-10 en los AAA, de modo que un incremento en la liberación de la citoquina proinflamatoria IL-6 no parece acompañarse de un aumento en la liberación de IL-10 para contrarrestar el estado proinflamatorio en el aneurisma.

En relación con estos resultados, otros autores también han observado niveles diferentes de expresión de IL-6 e IL-10 en patologías relacionadas con distintos estados inflamatorios (228). Además, se ha demostrado una distinta sensibilidad de IL-6 e IL-10 frente a la contrarregulación del SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*) en macrófagos humanos, sugiriendo la posibilidad de una distinta regulación de estas interleuquinas, pudiendo existir diferencias en su comportamiento frente a la respuesta inflamatoria (229).

Una observación paradójica del presente estudio fue que el rivaroxabán incrementara la liberación de IL-10 en las muestras de AAA respecto a las muestras de aorta sana y a los aneurismas incubados sin rivaroxabán. De este modo, la ratio IL-6/IL-10 fue marcadamente mayor en los AAA sin rivaroxabán respecto a los controles y marcadamente menor en los AAA incubados con rivaroxabán respecto a los controles y a los AAA incubados sin el fármaco.

Este hallazgo ya había sido descrito previamente por Laurent *et al.* en un estudio en el que se analizaron los efectos del rivaroxabán y el fondaparinux en la actividad de los monocitos y la liberación de citoquinas (230). En dicho estudio, el rivaroxabán indujo también un fuerte aumento en la liberación de IL-10 (198% de la secreción normal de las células THP-1 activadas). Los autores relacionaron también este aumento en IL-10 con el efecto protector del rivaroxabán en aterosclerosis.

El hecho de que en el sobrenadante de los explantes de AAA, la producción de IL-10 no se modificara respecto al control, pero sí estuviera aumentada en los AAA incubados con

rivaroxabán podría sugerir un efecto independiente del rivaroxabán respecto al FXa endógeno.

En relación a esto, previamente se ha descrito en un trabajo en arterias femorales de pacientes diabéticos un posible efecto del rivaroxabán no relacionado con el FXa en la expresión de transportadores mitocondriales de ácidos grasos de cadena larga (149). Como también se recoge en ese trabajo, se detectaron metabolitos derivados del rivaroxabán que impiden descartar que algunos de los efectos aparentemente independientes del FXa del rivaroxabán puedan deberse a dichos metabolitos (231). Sin embargo, el análisis de esta hipótesis se sale de los objetivos de este trabajo, por lo que son necesarios estudios específicos adicionales para poder demostrarlo.

7.3. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO EN MUESTRAS DE AAA HUMANO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LAS MISMAS

Numerosos estudios han identificado el estrés oxidativo como una de las principales causas de progresión de los AAA (232, 233).

Tanto las células inflamatorias infiltradas como las propias células vasculares, son capaces de formar ROS, particularmente anión superóxido, en los AAA, habiéndose demostrado una producción local aumentada de dicho anión en aneurismas humanos (125). Por otro lado, se ha sugerido que la mayor fuente de ROS libres proviene de la actividad de las NADPH oxidasas (125, 234).

En este estudio, la subunidad gp67-phox de la NADPH oxidasa citosólica y la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial, se encontraron aumentadas en las muestras de aneurisma.

Estos resultados ya habían sido descritos previamente por Guzik *et al.*, que sugirieron una relación estrecha entre los AAA y una actividad aumentada de la NADPH oxidasa, ya que este aumento de producción del anión superóxido puede promover la activación de metaloproteasas implicadas en el desarrollo de los mismos. En ese estudio se observó también que una mayor producción de anión superóxido por el AAA se asociaba directamente con un mayor riesgo de mortalidad (233).

Otros grupos de investigación han conseguido evitar el desarrollo de aneurismas mediante la disminución de la producción de ROS (235) y/o el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes en modelos experimentales (236), confirmando la importancia de éstos en el crecimiento de los AAA. Por esta razón, diferentes autores han propuesto el estrés oxidativo como una diana terapéutica para la prevención de la enfermedad aneurismática (237-239).

Como se ha señalado previamente, estudios en modelos experimentales de AAA han confirmado que tanto las NADPH oxidasas como la NOS2 tienen un papel central en la producción de RL en AAA. La depleción de NADPH en ratones (129) así como la depleción de NOS (123) atenúan el crecimiento aneurismático en condiciones experimentales, preservándose la estructura de la pared aórtica. Por ello, varios grupos sugieren la NADPH oxidasa como una molécula clave para la creación de esta diana

terapéutica (240, 241). No obstante, por ahora ninguno de los antioxidantes estudiados ha conseguido resultados clínicos relevantes en ensayos in vivo (242, 243).

El FXa ha demostrado aumentar el estrés oxidativo en células de músculo liso vascular humanas (145, 146), por lo que su inhibición podría ser también una opción para disminuir este mecanismo etiopatogénico.

En este estudio, el inhibidor del FXa rivaroxabán redujo significativamente el nivel de expresión de las subunidades 67- y 91-phox de la de NADPH oxidasa en las muestras aneurismáticas, confirmando la participación del FXa en esa expresión aumentada. Este efecto protector del fármaco frente al estrés oxidativo ya había sido descrito previamente en estudios con mitocondrias (244) y en animales.

El grupo del Dr. López-Farré también obtuvo resultados similares en un trabajo previo en el que se demostró que el rivaroxabán reducía la expresión de proteínas relacionadas con estrés oxidativo (149) e Ishibashi *et al.* hallaron el mismo efecto en células tubulares epiteliales de riñón humano (245).

En cuanto al potencial terapéutico de esta acción del fármaco, Imam *et al.* consiguieron, en un estudio con ratas, evitar la cardiotoxicidad producida por sunitinib mediante rivaroxabán, al disminuir los ROS en sus muestras e inhibir por tanto la inflamación mediada por el estrés oxidativo (246). Otros grupos han conseguido mediante este mecanismo disminuir el daño por isquemia/reperfusión periférica (194).

Vilaseca *et al.* observaron también esta disminución del estrés oxidativo en células hepáticas de ratas (247) y otros inhibidores directos del FXa como el edoxabán han presentado efectos similares en otros estudios (248). Esta acción sobre el estrés oxidativo a través de la NADPH oxidasa se ha visto también implicada en la inhibición de la agregación plaquetaria y la potenciación del efecto de la aspirina (249), lo que ayuda a explicar los resultados de los ensayos COMPASS y ATLAS mencionados previamente (222, 225).

El hecho de que el nivel de expresión proteica de las subunidades 67- y 91-phox de la de NADPH oxidasa se viera modificado por el rivaroxabán, pero los cambios en la subunidad gp47-phox no alcanzaran significación estadística en este estudio puede deberse a los mecanismos de regulación de las diferentes subunidades de la NADPH oxidasa.

Siu *et al.* estudiaron la activación y acción de diferentes isoformas de la NADPH oxidasa en modelos murinos de AAA y encontraron diferente regulación e implicación en la formación de AAA para las cuatro isoformas analizadas (250). Por otro lado, en el ya citado artículo de Jobi *et al.* que analiza la activación de la vía PAR-2 por el FXa en células de endotelio vascular, se observó que dicha activación está regulada por el estrés oxidativo modulado por este factor. En dicho estudio, el FXa aumentó la isoforma NOX-1 (homólogo de gp91phox) tanto a nivel de mRNA como de expresión proteica. No obstante, el FXa no tuvo ningún efecto significativo sobre NOX-4 o gp47phox (145).

Esta diferencia en la modulación de la vía de activación podría explicar que, en el presente estudio, la inhibición del FXa por el rivaroxabán tuviera un efecto menor en la subunidad gp47phox que en gp91phox.

Otro estudio de Park *et al.* demostró también, en un modelo de arteria coronaria de ratones diabéticos, que la regulación entre PAR-2 y la NADPH oxidasa es bidireccional, de forma que PAR-2 también regula la expresión de la subunidad gp91phox, sin presentar un efecto significativo en gp67phox, gp47phox, o gp22phox (251). Aunque el artículo reconoce que aún no se ha esclarecido del todo la interacción entre PAR-2 y la NADPH oxidasa, la subunidad gp91phox parece presentar un papel central en la disfunción endotelial producida por el estrés oxidativo en arteria coronaria.

Por último, se ha sugerido previamente que la NOS2, cuya expresión se redujo significativamente por el rivaroxabán en las muestras aneurismáticas, puede ser el vínculo entre la inflamación y el estrés oxidativo en los aneurismas, ya que el NOS2 ha demostrado ser también una fuente primaria de anión superóxido en los mismos (233).

De este modo, aunque en este estudio se han analizado por separado los efectos del rivaroxabán en la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo, estos dos fenómenos están íntimamente relacionados entre sí y el progreso en la comprensión de estos mecanismos de regulación recíproca y sinergia probablemente ayuden a avanzar en el desarrollo de fármacos que puedan modular estos procesos y prevenir la enfermedad aneurismática.

7.4. NIVELES DE MMP-9 EN MUESTRAS DE AAA HUMANO, ASOCIACIÓN CON PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN Y EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO DEL RIVAROXABÁN SOBRE LOS MISMOS

Como se ha señalado previamente, es ampliamente conocido que los AAA presentan niveles aumentados de MMP. Su acción ha sido bien caracterizada y se ha demostrado su papel central en la etiopatogenia de la enfermedad (100, 252-254).

De entre estas MMP, la MMP-9 es la que se produce en mayor cantidad por el tejido aneurismático y con la mayor diferencia de expresión entre tejido sano y muestras de AAA (98) y es la más importante en la patogénesis y progresión de aneurismas tanto en humanos como en modelos animales (100-102). Estos hallazgos se han confirmado en el presente estudio, en los que las muestras de AAA expresaron niveles más altos de MMP-9 que los controles de aorta abdominal sana.

Numerosos estudios han descrito efectos inhibitorios en la progresión de AAA experimentales mediante inhibidores de las metaloproteasas (255, 256). Del mismo modo, se ha demostrado protección frente a la formación de aneurismas en ratones *knockout* para la MMP-9, en los que la lámina elástica se encuentra morfológicamente preservada (103). Por ello, MMP-9 se ha considerado como una de las dianas terapéuticas con mayor potencial para el tratamiento médico del AAA.

Sin embargo, ninguna de los inhibidores estudiados hasta la fecha ha presentado una eficacia clínica relevante al trasladar estos estudios a ensayos con pacientes (68, 69, 256).

Los resultados de este trabajo muestran que los niveles de MMP-9 en la pared aórtica se correlacionan directamente con la expresión de NOS2 y la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa a dicho nivel. Además, tanto la liberación de IL-6 como la ratio IL-6/IL-10 se relacionaron también de forma directa con dichos niveles de MMP-9. Todos estos datos sugieren y apoyan la hipótesis de que todos estos mecanismos están íntimamente asociados con la progresión del AAA.

Numerosos estudios han confirmado que uno de los principales moduladores de la actividad de MMP es el estrés oxidativo (232, 257). Se ha demostrado que las ROS degradan la matriz extracelular mediante la activación de MMP (258) y la sobreexpresión de NADPH oxidasa aumenta la actividad de MMP en aneurismas humanos (259).

Algunos estudios experimentales han demostrado también que la disminución de este estrés oxidativo mediante la pérdida de NADPH oxidasas y NOS2 reduce la expresión de MMP-9 en muestras de tejido aórtico, previniendo la formación de AAA (129, 260).

De forma similar, se ha demostrado ampliamente la implicación de los procesos inflamatorios en la regulación de las MMP (261).

En patología aneurismática se ha observado que las citoquinas proinflamatorias aumentan la producción de MMP-9 en las células de tejido vascular, contribuyendo al crecimiento del AAA (262, 263) y que en esta regulación influye también la acción de los linfocitos

T en la expresión de las MMP (264). Esta relación se ha confirmado en muestras de AAA humano, en las que los infiltrados inflamatorios son una fuente importante de MMP en el aneurisma (265).

De este modo podemos especular que la inhibición del FXa por rivaroxabán, al reducir la inflamación y el estrés oxidativo en los AAA, podría también alterar los mecanismos asociados a la progresión del AAA, como la expresión de MMP-9, disminuyendo los mismos. Este hecho se ha visto confirmado en el presente estudio, en el que el rivaroxabán redujo de forma importante los niveles de expresión de MMP-9 en las muestras aneurismáticas.

Previamente se había descrito ya en otras patologías la reducción de MMP mediante rivaroxabán: Gul Utku *et al.* demostraron que este fármaco era incluso más efectivo que la metilprednisolona en cuanto a recuperación de mucosa en modelos de colitis en ratas, mediante la disminución del estrés oxidativo y las MMP (266). Terry *et al.* observaron también un descenso de marcadores inflamatorios y de MMP-9 en ratas con catéteres venosos centrales tratados con rivaroxabán respecto a los controles (267) y estos resultados se han confirmado también al usar rivaroxabán como pretratamiento en ratas a las que se induce infarto cerebral (268) y en modelos de aterosclerosis en aorta de rata (219).

7.5. COMENTARIOS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio presenta varias limitaciones. La más importante probablemente sea el pequeño tamaño muestral, no obstante, los resultados observados en todas las muestras han sido muy consistentes. Por otro lado, únicamente se han incluido muestras de AAA que presentaban trombo intraluminal, al estimarse que en estas condiciones el papel del FXa podría ser más evidente y encontrarse este presente en tres cuartas partes de los aneurismas (91). Sin embargo, se están realizando ya nuevos estudios comparativos en muestras aneurismáticas sin trombo.

Otra limitación ya mencionada es la imposibilidad de analizar el impacto del tratamiento farmacológico previo en las diferencias observadas entre los controles y los AAA debido al anonimato del proceso de donación de órganos. No obstante, tal y como se ha mencionado previamente, es importante resaltar que el objetivo principal del estudio es analizar el papel del FXa endógeno en AAA en la expresión de proteínas asociadas con la inflamación y el estrés oxidativo y los valores obtenidos en los donantes de órganos se han usado únicamente como aproximación de los valores normales en pacientes sanos.

La concentración de rivaroxabán utilizada en el estudio, se encuentra dentro del rango de concentración en plasma del fármaco tras administración de una dosis terapéutica del mismo (269). De hecho, 50 nmol/L de rivaroxabán equivale a aproximadamente 200 µg/L de rivaroxabán, concentración que es alcanzada en pacientes tratados con 20 mg una vez al día (269).

Por otro lado, es importante resaltar que los resultados de este estudio se refieren únicamente al rivaroxabán, por lo que se necesitan nuevos estudios para analizar si otros inhibidores del FXa o incluso otros fármacos anticoagulantes con actividad sobre otros factores de la cascada de la coagulación podrían ejercer efectos similares a los del rivaroxabán en la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo en AAA.

Como también se ha indicado previamente, es posible que alguno de los efectos observados, como la liberación de IL-10, pueda deberse a un efecto independiente del rivaroxabán respecto al FXa endógeno o a la acción de alguno de sus metabolitos. Sin embargo, este estudio no estaba diseñado para diferenciar estos mecanismos y el análisis de esta teoría se sale de los objetivos del trabajo.

Finalmente, en este estudio, los efectos del rivaroxabán en la expresión de proteínas relacionadas con la inflamación y el estrés oxidativo se han tratado por separado. Sin embargo, ambas están íntimamente relacionadas. De hecho, pueden considerarse parte de un círculo vicioso donde cada una actúa como promotora de la otra. De este modo, aunque los resultados obtenidos han mostrado claramente cambios en la expresión y liberación de diferentes biomarcadores o enzimas relacionadas con la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en muestras de AAA humanos incubadas con rivaroxabán, no se puede saber si estos cambios se deben a efectos independientes del fármaco en cada uno de ellos o a la acción preferencial de la inhibición del FXa en uno de los dos, que pueda producir cambios en el resto de los mecanismos asociados con los AAA estudiados aquí.

7.6. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Nos encontramos ante una patología, el AAA, con una morbimortalidad importante y ningún tratamiento médico que haya resultado ser efectivo en la práctica clínica para evitar su aparición, crecimiento y ruptura. Por ello, el potencial terapéutico de un fármaco que pueda actuar sobre el aneurisma revirtiendo sus mecanismos etiopatogénicos es enorme y deben continuarse los esfuerzos por encontrar esta alternativa farmacológica al tratamiento quirúrgico y endovascular.

Esta tesis ha puesto de relieve por primera vez la importancia del FXa en la etiopatogenia de los aneurismas en humanos y la acción de su inhibidor, el rivaroxabán, para prevenir estas alteraciones en la pared aórtica. Por ello, la investigación futura para dilucidar el papel que este fármaco puede tener en la patología aneurismática debe tener una doble vertiente.

Por un lado, se ha de continuar esta vía de investigación preclínica para esclarecer aquellas cuestiones que este estudio no ha podido contestar: el efecto del FXa y el rivaroxabán en la formación de AAA sin trombo intraluminal, los efectos directos del fármaco sobre la arteria independientes del FXa y los posibles efectos de sus metabolitos. Entendiendo mejor los mecanismos de actuación de este fármaco sobre dicha patología, se podrán diseñar nuevas moléculas más eficaces dirigidas a los puntos claves del desarrollo de esta enfermedad. Además, sería interesante estudiar el efecto de otros inhibidores directos del FXa sobre los aneurismas humanos y comparar estos efectos y sus mecanismos con los que se han encontrado en el rivaroxabán.

Por otro lado, al tratarse el rivaroxabán de un fármaco aprobado y ampliamente utilizado a nivel mundial para las indicaciones referidas previamente, pueden diseñarse estudios clínicos de cohortes para analizar el efecto que ha tenido esta medicación en la incidencia, desarrollo y morbimortalidad del aneurisma en pacientes tratados con rivaroxabán durante los últimos años, comparándolo con pacientes sin tratamiento anticoagulante o con otros anticoagulantes con diferente mecanismo de acción.

La confirmación de la relevancia clínica de este fármaco para prevenir el AAA en estos estudios retrospectivos in vivo aportaría la evidencia necesaria para diseñar ensayos clínicos prospectivos que permitan hacer llegar a nuestros pacientes un fármaco efectivo para su patología.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. En el aneurisma de aorta abdominal existe un aumento de expresión del FXa respecto a la pared vascular de la aorta sana.
2. El FXa contribuye a crear un estado inflamatorio en el aneurisma, con aumento de la interleuquina proinflamatoria IL-6, la NOS2 y la ratio IL-6/IL-10 respecto a la aorta sana.
3. El rivaroxabán revierte estos efectos inflamatorios in vitro, disminuyendo la liberación de IL-6 y NOS2, y aumentando de forma significativa la liberación de la interleuquina antiinflamatoria IL-10. De este modo, es capaz de generar un estado antiinflamatorio con una disminución de la ratio IL-6/IL-10 en comparación con los aneurismas incubados sin fármaco e incluso respecto a la aorta sana.
4. El FXa contribuye también al estrés oxidativo en el aneurisma, con aumento de la expresión de las subunidades gp67-phox de la NADPH oxidasa citosólica y gp91-phox de la NADPH oxidasa mitocondrial respecto a la aorta sana.
5. El rivaroxabán revierte estos efectos sobre el estrés oxidativo en el aneurisma, disminuyendo la expresión de estas subunidades de la NADPH oxidasa hasta niveles similares a las muestras de control.

6. La metaloproteasa con mayor implicación en la formación de aneurismas, la MMP-9, se encuentra aumentada en los aneurismas en relación con la aorta sana.
7. Los niveles de expresión de la MMP-9 se relacionaron directamente con los niveles de NOS2, de la subunidad gp91-phox de la NADPH oxidasa, de IL-6 y con la ratio IL-6/IL-10. Esto confirma la regulación que ejercen factores inflamatorios y el estrés oxidativo en la expresión de MMP-9.
8. El rivaroxabán redujo la expresión de MMP-9 en los aneurismas hasta niveles similares a los encontrados en las aortas de control.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. *J Vasc Surg* 1991;13(3):452-8.
2. Wanhainen A, Verzini F, Van Herzele I, Allaire E, Bown M, Cohnert T, et al. 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 Jan;57(1):8-93
3. Li K, Zhang K, Li T, Zhai S. Primary results of abdominal aortic aneurysm screening in the at-risk residents in middle China. *BMC Cardiovasc Disord* 2018;18(1):60.
4. Sweeting MJ, Masconi KL, Jones E, Ulug P, Glover MJ, Michaels JA, et al. Analysis of clinical benefit, harms, and cost-effectiveness of screening women for abdominal aortic aneurysm. *Lancet* 2018;392(10146):487-95.
5. Kent KC. Clinical practice. Abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2014;371(22):2101-8.
6. Sampson UK, Norman PE, Fowkes FG, Aboyans V, Song Y, Harrell FE, Jr., et al. Estimation of global and regional incidence and prevalence of abdominal aortic aneurysms 1990 to 2010. *Glob Heart* 2014;9(1):159-70.
7. Svensjo S, Bjorck M, Gurtelschmid M, Djavani Gidlund K, Hellberg A, Wanhainen A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation* 2011;124(10):1118-23.

8. Jacomelli J, Summers L, Stevenson A, Lees T, Earnshaw JJ. Impact of the first 5 years of a national abdominal aortic aneurysm screening programme. *Br J Surg* 2016;103(9):1125-31.
9. Grondal N, Sogaard R, Lindholt JS. Baseline prevalence of abdominal aortic aneurysm, peripheral arterial disease and hypertension in men aged 65-74 years from a population screening study (VIVA trial). *Br J Surg* 2015;102(8):902-6.
10. Lee ES, Pickett E, Hedayati N, Dawson DL, Pevec WC. Implementation of an aortic screening program in clinical practice: implications for the Screen For Abdominal Aortic Aneurysms Very Efficiently (SAAAVE) Act. *J Vasc Surg* 2009;49(5):1107-11.
11. Ulug P, Powell JT, Sweeting MJ, Bown MJ, Thompson SG. Meta-analysis of the current prevalence of screen-detected abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg* 2016;103(9):1097-104.
12. 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;129(7):747-53.
13. Laine MT, Laukontaus SJ, Kantonen I, Venermo M. Population-based study of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2016;103(12):1634-9.
14. Dreyer SB, Burns P. Ruptured abdominal aortic aneurysms: decreasing incidence may reduce the impact of a Scottish screening programme. *Scott Med J* 2015;60(1):23-8.
15. Lilja F, Mani K, Wanhainen A. Editor's Choice - Trend-break in Abdominal Aortic Aneurysm Repair With Decreasing Surgical Workload. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2017;53(6):811-9.

16. Schermerhorn ML, Bensley RP, Giles KA, Hurks R, O'Malley A J, Cotterill P, et al. Changes in abdominal aortic aneurysm rupture and short-term mortality, 1995-2008: a retrospective observational study. *Ann Surg* 2012;256(4):651-8.
17. Alcorn HG, Wolfson SK, Jr., Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(8):963-70.
18. Lederle FA. The strange relationship between diabetes and abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;43(3):254-6.
19. Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2015;3(2):105-13.
20. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, Hultgren R, Swedenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg* 2010;51(1):3-7; discussion
21. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med* 2000;160(10):1425-30.
22. Stackelberg O, Bjorck M, Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Sex differences in the association between smoking and abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2014;101(10):1230-7.
23. Jahangir E, Lipworth L, Edwards TL, Kabagambe EK, Mumma MT, Mensah GA, et al. Smoking, sex, risk factors and abdominal aortic aneurysms: a prospective study of

- 18 782 persons aged above 65 years in the Southern Community Cohort Study. *J Epidemiol Community Health* 2015;69(5):481-8.
24. Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 2012;99(5):655-65.
25. Oliver-Williams C, Sweeting MJ, Turton G, Parkin D, Cooper D, Rodd C, et al. Lessons learned about prevalence and growth rates of abdominal aortic aneurysms from a 25-year ultrasound population screening programme. *Br J Surg* 2018;105(1):68-74.
26. Choksy SA, Wilmink AB, Quick CR. Ruptured abdominal aortic aneurysm in the Huntingdon district: a 10-year experience. *Ann R Coll Surg Engl* 1999;81(1):27-31.
27. Bown MJ, Sutton AJ, Bell PR, Sayers RD. A meta-analysis of 50 years of ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 2002;89(6):714-30.
28. Silverberg E, Boring CC, Squires TS. Cancer statistics, 1990. *CA Cancer J Clin* 1990;40(1):9-26.
29. Karkos CD, Mukhopadhyay U, Papakostas I, Ghosh J, Thomson GJ, Hughes R. Abdominal aortic aneurysm: the role of clinical examination and opportunistic detection. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;19(3):299-303.
30. Lederle FA, Walker JM, Reinke DB. Selective screening for abdominal aortic aneurysms with physical examination and ultrasound. *Arch Intern Med* 1988;148(8):1753-6.
31. 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;17(6):472-5.

32. Beales L, Wolstenhulme S, Evans JA, West R, Scott DJ. Reproducibility of ultrasound measurement of the abdominal aorta. *Br J Surg* 2011;98(11):1517-25.
33. 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.
34. Shuman WP, Hastrup W, Jr., Kohler TR, Nyberg DA, Wang KY, Vincent LM, et al. Suspected leaking abdominal aortic aneurysm: use of sonography in the emergency room. *Radiology* 1988;168(1):117-9.
35. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Variability in measurement of abdominal aortic aneurysms. Abdominal Aortic Aneurysm Detection and Management Veterans Administration Cooperative Study Group. *J Vasc Surg* 1995;21(6):945-52.
36. Foo FJ, Hammond CJ, Goldstone AR, Abuhamdiah M, Rashid ST, West RM, et al. Agreement between computed tomography and ultrasound on abdominal aortic aneurysms and implications on clinical decisions. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011;42(5):608-14.
37. Mora C, Marcus C, Barbe C, Ecarnot F, Long A. Measurement of maximum diameter of native abdominal aortic aneurysm by angio-CT: reproducibility is better with the semi-automated method. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014;47(2):139-50.
38. Mora CE, Marcus CD, Barbe CM, Ecarnot FB, Long AL. Maximum Diameter of Native Abdominal Aortic Aneurysm Measured by Angio-Computed Tomography: Reproducibility and Lack of Consensus Impacts on Clinical Decisions. *Aorta (Stamford)* 2015;3(2):47-55.

39. Hertault A, Maurel B, Sobocinski J, Martin Gonzalez T, Le Roux M, Azzaoui R, et al. Impact of hybrid rooms with image fusion on radiation exposure during endovascular aortic repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014;48(4):382-90.
40. McNally MM, Scali ST, Feezor RJ, Neal D, Huber TS, Beck AW. Three-dimensional fusion computed tomography decreases radiation exposure, procedure time, and contrast use during fenestrated endovascular aortic repair. *J Vasc Surg* 2015;61(2):309-16.
41. Martin-Moreno PL, Varo N, Martinez-Anso E, Martin-Calvo N, Sayon-Orea C, Bilbao JJ, et al. Comparison of Intravenous and Oral Hydration in the Prevention of Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Low-Risk Patients: A Randomized Trial. *Nephron* 2015;131(1):51-8.
42. Brambilla M, Cerini P, Lizio D, Vigna L, Carriero A, Fossaceca R. Cumulative radiation dose and radiation risk from medical imaging in patients subjected to endovascular aortic aneurysm repair. *Radiologia Med* 2015;120(6):563-70.
43. Blaszak MA, Juszkat R. Monte Carlo simulations for assessment of organ radiation doses and cancer risk in patients undergoing abdominal stent-graft implantation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2014;48(1):23-8.
44. Engellau L, Albrechtsson U, Dahlstrom N, Norgren L, Persson A, Larsson EM. Measurements before endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. MR imaging with MRA vs. angiography and CT. *Acta Radiol* 2003;44(2):177-84.
45. Reeps C, Essler M, Pelisek J, Seidl S, Eckstein HH, Krause BJ. Increased 18F-fluorodeoxyglucose uptake in abdominal aortic aneurysms in positron emission/computed tomography is associated with inflammation, aortic wall instability, and acute symptoms. *J Vasc Surg* 2008;48(2):417-23; discussion 24.

46. Murakami M, Morikage N, Samura M, Yamashita O, Suehiro K, Hamano K. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography for diagnosis of infected aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2014;28(3):575-8.
47. Mitra A, Pencharz D, Davis M, Wagner T. Determining the Diagnostic Value of 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission/Computed Tomography in Detecting Prosthetic Aortic Graft Infection. *Ann Vasc Surg* 2018;53:78-85.
48. Lindholt JS, Juul S, Fasting H, Henneberg EW. Screening for abdominal aortic aneurysms: single centre randomised controlled trial. *BMJ* 2005;330(7494):750.
49. Ashton HA, Buxton MJ, Day NE, Kim LG, Marteau TM, Scott RA, 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.
50. Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM, Le MT, Spencer CA, Tuohy RJ, et al. Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *BMJ* 2004;329(7477):1259.
51. Scott RA, Wilson NM, Ashton HA, Kay DN. Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: 5-year results of a randomized controlled study. *Br J Surg* 1995;82(8):1066-70.
52. Scott RA, Bridgewater SG, Ashton HA. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg* 2002;89(3):283-5.
53. Cosford PA, Leng GC. Screening for abdominal aortic aneurysm. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 Apr 18;(2):CD002945.

54. Wanhainen A, Hultgren R, Linne A, Holst J, Gottsater A, Langenskiold M, et al. Outcome of the Swedish Nationwide Abdominal Aortic Aneurysm Screening Program. *Circulation* 2016;134(16):1141-8.
55. Filardo G, Powell JT, Martinez MA, Ballard DJ. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev* 2015 Feb 8;2015(2):CD001835.
56. Soden PA, Zettervall SL, Ultee KH, Darling JD, Buck DB, Hile CN, et al. Outcomes for symptomatic abdominal aortic aneurysms in the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program. *J Vasc Surg* 2016;64(2):297-305.
57. Kurvers H, Veith FJ, Lipsitz EC, Ohki T, Gargiulo NJ, Cayne NS, et al. Discontinuous, staccato growth of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg* 2004;199(5):709-15.
58. Sharp MA, Collin J. A myth exposed: fast growth in diameter does not justify precocious abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;25(5):408-11.
59. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg* 1999;230(3):289-96; discussion 96-7.
60. Bown MJ, Sweeting MJ, Brown LC, Powell JT, Thompson SG. Surveillance intervals for small abdominal aortic aneurysms: a meta-analysis. *JAMA* 2013;309(8):806-13.

61. Grootenboer N, van Sambeek MR, Arends LR, Hendriks JM, Hunink MG, Bosch JL. Systematic review and meta-analysis of sex differences in outcome after intervention for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2010;97(8):1169-79.
62. Volodos NL, Shekhanin VE, Karpovich IP, Troian VI, Gur'ev Iu A. [A self-fixing synthetic blood vessel endoprosthesis]. *Vestn Khir Im I I Grek* 1986;137(11):123-5.
63. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1991;5(6):491-9.
64. Dua A, Kuy S, Lee CJ, Upchurch GR, Jr., Desai SS. Epidemiology of aortic aneurysm repair in the United States from 2000 to 2010. *J Vasc Surg* 2014;59(6):1512-7.
65. Greenhalgh RM, Brown LC, Kwong GP, Powell JT, Thompson SG. 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;364(9437):843-8.
66. Kiru G, Bicknell C, Falaschetti E, Powell J, Poulter N. An evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the growth rate of small abdominal aortic aneurysms: a randomised placebo-controlled trial (AARDVARK). *Health Technol Assess* 2016;20(59):1-180.
67. Meijer CA, Stijnen T, Wasser MN, Hamming JF, van Bockel JH, Lindeman JH. Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2013;159(12):815-23.
68. Rughani G, Robertson L, Clarke M. Medical treatment for small abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 Sep 12;(9):CD009536.

69. Kokje VB, Hamming JF, Lindeman JH. 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.
70. 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 Sports Exerc* 2014;46(1):2-9.
71. Climent E, Benaiges D, Chillaron JJ, Flores-Le Roux JA, Pedro-Botet J. Diabetes mellitus as a protective factor of abdominal aortic aneurysm: Possible mechanisms. *Clin Investig Arterioscler* 2018;30(4):181-7.
72. 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.
73. Fujimura N, Xiong J, Kettler EB, Xuan H, Glover KJ, Mell MW, et al. Metformin treatment status and abdominal aortic aneurysm disease progression. *J Vasc Surg* 2016;64(1):46-54.e8.
74. Hsu CY, Su YW, Chen YT, Tsai SH, Chang CC, Li SY, et al. Association between use of oral-antidiabetic drugs and the risk of aortic aneurysm: a nested case-control analysis. *Cardiovasc Diabetol* 2016;15(1):125.
75. Golledge J, Morris DR, Pinchbeck J, Rowbotham S, Jenkins J, Bourke M, et al. Editor's Choice - Metformin Prescription is Associated with a Reduction in the Combined Incidence of Surgical Repair and Rupture Related Mortality in Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2019;57(1):94-101.

76. Itoga NK, Rothenberg KA, Suarez P, Ho TV, Mell MW, Xu B, et al. Metformin prescription status and abdominal aortic aneurysm disease progression in the U.S. veteran population. *J Vasc Surg* 2019;69(3):710-6.e3.
77. Kristensen KL, Pottegard A, Hallas J, Rasmussen LM, Lindholt JS. Metformin treatment does not affect the risk of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2017;66(3):768-74.e2.
78. Wang SK, Green LA, Gutwein AR, Kenyon B, Motaganahalli RL, Fajardo A, et al. Metformin does not reduce inflammation in diabetics with abdominal aortic aneurysm or at high risk of abdominal aortic aneurysm formation. *Vascular* 2018;26(6):608-14.
79. Weintraub NL. Understanding abdominal aortic aneurysm. *The New England journal of medicine*. 2009;361(11):1114-6.
80. Sidawy AN, Sumpio BE, DePalma RG, Marty AT. The basic science of vascular disease. *Chest* 1997;112(2):A36.
81. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;100(2):158-73.
82. Lévy BI, Tedgui A. *Biology of the arterial wall* Dordrecht; Boston: Kluwer Academic; 1999.
83. Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophys J* 2003;85(1):637-45.
84. Kramer RH, Bensch KG, Davison PM, Karasek MA. Basal lamina formation by cultured microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* 1984;99(2):692-8.
85. Wang CX, Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol* 2007;83(3):140-8.

86. Sims FH. The initiation of intimal thickening in human arteries. *Pathology* 2000;32(3):171-5.
87. Sims FH, Gavin JB, Edgar S, Koelmeyer TD. Comparison of the endothelial surface and subjacent elastic lamina of anterior descending coronary arteries at the location of atheromatous lesions with internal thoracic arteries of the same subjects: a scanning electron microscopic study. *Pathology* 2002;34(5):433-41.
88. Dobrin PB. Distribution of lamellar deformations: implications for properties of the arterial media. *Hypertension* 1999;33(3):806-10.
89. Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M. Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension* 1998;32(1):170-5.
90. Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circ Res* 1967;20(1):99-111.
91. 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;34(2):291-9.
92. 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;38(6):1283-92.
93. Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 2011;90(1):18-27.
94. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WR, 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;26(9):2077-82.

95. 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.

96. Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2002;35(3):539-46.

97. Basu R, Fan D, Kandalam V, Lee J, Das SK, Wang X, et al. Loss of Timp3 gene leads to abdominal aortic aneurysm formation in response to angiotensin II. *J Biol Chem* 2012;287(53):44083-96.

98. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH. In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(8):1139-44.

99. Ramella M, Bernardi P, Fusaro L, Manfredi M, Casella F, Porta CM, et al. Relevance of inflammation and matrix remodeling in abdominal aortic aneurysm (AAA) and popliteal artery aneurysm (PAA) progression. *Am J Transl Res* 2018;10(10):3265-75.

100. Yamashita A, Noma T, Nakazawa A, Saito S, Fujioka K, Zempo N, et al. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 in abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2001;25(3):259-65.

101. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999;29(1):122-7; discussion 7-9.
102. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96(7):2228-32.
103. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 2000;105(11):1641-9.
104. Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, Melas N, Saratzis N, Kitas GD. Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology* 2011;62(1):18-32.
105. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation* 2001;104(3):304-9.
106. 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.
107. Abisi S, Burnand KG, Waltham M, Humphries J, Taylor PR, Smith A. Cysteine protease activity in the wall of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2007;46(6):1260-6.
108. Shi GP, Sukhova GK, Grubb A, Ducharme A, Rhode LH, Lee RT, et al. Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1999;104(9):1191-7.

109. Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambris JD, Atkinson JP, et al. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 2009;119(13):1805-13.
110. Wanhainen A, Nilsson TK, Bergqvist D, Boman K, Bjorck M. Elevated tissue plasminogen activator in patients with screening-detected abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2007;45(6):1109-13.
111. Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, Freeman MB, Donnell R, Carroll RC, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas. *J Vasc Surg* 2000;31(3):567-76.
112. Miyagawa K, Ogata T, Ueyama T, Kasahara T, Nakanishi N, Naito D, et al. Loss of MURC/Cavin-4 induces JNK and MMP-9 activity enhancement in vascular smooth muscle cells and exacerbates abdominal aortic aneurysm. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;487(3):587-93.
113. Walker DI, Bloor K, Williams G, Gillie I. Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta. *Br J Surg* 1972;59(8):609-14.
114. Monux G, Serrano FJ, Vigil P, De la Concha EG. Role of HLA-DR in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26(2):211-4.
115. Hamano K, Li TS, Takahashi M, Kobayashi T, Shirasawa B, Ito H, et al. Enhanced tumor necrosis factor- α expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg* 2003;27(4):476-80.
116. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Ramey WG, Tilson MD. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1994;90(5 Pt 2):Ii224-7.

117. 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.
118. Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjala H, et al. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(11):2843-7.
119. Dawson J, Cockerill G, Choke E, Loftus I, Thompson MM. Aortic aneurysms as a source of circulating interleukin-6. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1085:320-3.
120. Treska V, Kocova J, Boudova L, Neprasova P, Topolcan O, Pecen L, et al. Inflammation in the wall of abdominal aortic aneurysm and its role in the symptomatology of aneurysm. *Cytokines Cell Mol Ther* 2002;7(3):91-7.
121. Lindholt JS, Shi GP. Chronic inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31(5):453-63.
122. Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest* 2004;114(2):168-71.
123. Armstrong PJ, Franklin DP, Carey DJ, Elmore JR. Suppression of experimental aortic aneurysms: comparison of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors. *Ann Vasc Surg* 2005;19(2):248-57.
124. Schonbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* 2002;161(2):499-506.
125. Miller FJ, Jr., Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(4):560-5.

126. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(6):813-39.
127. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004;34(9):619-25.
128. Jimenez-Rosales A, Amaya-Chavez A, Dominguez Garcia MV, Camarillo-Romero E, Huitron Bravo GG, Cruz AM. Association of inflammatory and oxidative stress biomarkers in subjects with cardiovascular risk. *Am J Ther* 2013;20(4):422-31.
129. 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.
130. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thompson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998;102(11):1900-10.
131. Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest* 1998;102(7):1413-20.
132. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527-61.
133. Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem* 2000;46(8 Pt 2):1260-9.

134. Nurden AT. Platelet membrane glycoproteins: a historical review. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(5):577-84.
135. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014;58(5):515-23.
136. 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.
137. Steinberg SF. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol* 2005;67(1):2-11.
138. Papapetropoulos A, Piccardoni P, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R, Cicala C, et al. Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa-nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4738-42.
139. Schaeffer P, Mares AM, Dol F, Bono F, Herbert JM. Coagulation factor Xa induces endothelium-dependent relaxations in rat aorta. *Circ Res* 1997;81(5):824-8.
140. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med* 2008;14(10):429-40.
141. Borensztajn K, Spek CA. Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15(3):341-9.
142. Koo BH, Kim DS. Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin. *J Biol Chem* 2003;278(52):52578-86.
143. Bono F, Schaeffer P, Herault JP, Michaux C, Nestor AL, Guillemot JC, et al. Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):E107-12.

144. Blanc-Brude OP, Archer F, Leoni P, Derian C, Bolsover S, Laurent GJ, et al. Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation. *Exp Cell Res* 2005;304(1):16-27.
145. 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.
146. Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E, Schror K. Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2000;84(3):499-505.
147. Busch G, Seitz I, Steppich B, Hess S, Eckl R, Schomig A, et al. Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(2):461-6.
148. Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoord R, van't Veer C, Hemker HC, et al. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998;161(8):4318-24.
149. Lopez-Farre AJ, Rodriguez-Sierra P, Modrego J, Segura A, Martin-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.
150. Moran CS, Seto SW, Krishna SM, Sharma S, Jose RJ, Biros E, et al. Parenteral administration of factor Xa/IIa inhibitors limits experimental aortic aneurysm and atherosclerosis. *Sci Rep* 2017;7:43079.
151. Allen-Redpath K, Aldrovandi M, Lauder SN, Gketsopoulou A, Tyrrell VJ, Slatter DA, et al. Phospholipid membranes drive abdominal aortic aneurysm development

through stimulating coagulation factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(16):8038-47.

152. 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.

153. 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.

154. Kolbel T, Strandberg K, Donath T, Mattiasson I, Stenflo J, Lindblad B. Activated protein C-protein C inhibitor complex in patients with abdominal aortic aneurysms: is it associated with diameter and growth rate? *Vasc Endovascular Surg* 2008;42(2):135-40.

155. 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.

156. Lupu C, Calb M, Ionescu M, Lupu F. Enhanced prothrombin and intrinsic factor X activation on blood platelets from diabetic patients. *Thromb Haemost* 1993;70(4):579-83.

157. Simao da Silva E, Rodrigues AJ, Magalhaes Castro de Tolosa E, Rodrigues CJ, Villas Boas do Prado G, Nakamoto JC. Morphology and diameter of infrarenal aortic aneurysms: a prospective autopsy study. *Cardiovasc Surg* 2000;8(7):526-32.

158. Vorp DA, Vande Geest JP. Biomechanical determinants of abdominal aortic aneurysm rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(8):1558-66.

159. Modrego J, Lopez-Farre AJ, Martinez-Lopez 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.

160. Thomas TF, Ganetsky V, Spinler SA. Rivaroxaban: an oral factor Xa inhibitor. *Clin Ther* 2013;35(1):4-27.
161. Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, Lampe T, Pernerstorfer J, Schlemmer KH, et al. Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-N-((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl)phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl)methyl)thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor. *J Med Chem* 2005;48(19):5900-8.
162. Xarelto. EPAR - Product information. European Medicines Agency. 2019. EMEA/H/C/000944 - II/0068.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/xarelto#product-information-section>
163. 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.
164. Ansell J. Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target? *J Thromb Haemost* 2007;5 Suppl 1:60-4.
165. DailyMed. UNIH. Current Medication Information for XARELTO (rivaroxaban). 2013 (citado en 2015).
166. Anderson L, Seilhamer J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 1997;18(3-4):533-7.
167. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999;19(3):1720-30.
168. Maithal K. Proteomics--a new player in the post-genomic era. *Indian J Biochem Biophys* 2002;39(5):291-302.

169. Albalat A, Mischak H, Mullen W. Clinical application of urinary proteomics/peptidomics. *Expert Rev Proteomics* 2011;8(5):615-29.
170. Zhang AH, Sun H, Yan GL, Han Y, Wang XJ. Serum proteomics in biomedical research: a systematic review. *Appl Biochem Biotechnol* 2013;170(4):774-86.
171. von zur Muhlen C, Schiffer E, Sackmann C, Zurbig P, Neudorfer I, Zirlik A, et al. Urine proteome analysis reflects atherosclerotic disease in an ApoE^{-/-} mouse model and allows the discovery of new candidate biomarkers in mouse and human atherosclerosis. *Mol Cell Proteomics* 2012;11(7):M111.013847.
172. Golledge J, Tsao PS, Dalman RL, Norman PE. Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression. *Circulation* 2008;118(23):2382-92.
173. Moxon JV, Liu D, Moran CS, Crossman DJ, Krishna SM, Yonglitthipagon P, et al. Proteomic and genomic analyses suggest the association of apolipoprotein C1 with abdominal aortic aneurysm. *Proteomics Clin Appl* 2014;8(9-10):762-72.
174. Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, et al. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001;103(18):2260-5.
175. Affirul CA, Azim IM, Hanafiah H, Nor Azmi K, Rozman Z. MMP-9: biomarker for abdominal aneurysm. *Clin Ter* 2013;164(6):e479-83.
176. Molacek J, Mares J, Treska V, Houdek K, Baxa J. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. *Surg Today* 2014;44(1):142-51.
177. Htun NM, Peter K. Biomarkers for AAA: Encouraging steps but clinical relevance still to be delivered. *Proteomics Clin Appl* 2014;8(9-10):732-4.
178. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.

179. Yamazumi K, Ojira M, Okumura H, Aikou T. An activated state of blood coagulation and fibrinolysis in patients with abdominal aortic aneurysm. *Am J Surg* 1998;175(4):297-301.
180. Hans SS, Jareunpoon O, Balasubramaniam M, Zelenock GB. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2005;41(4):584-8.
181. Satta J, Laara E, Juvonen T. Intraluminal thrombus predicts rupture of an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 1996;23(4):737-9.
182. Loeffen R, Spronk HM, ten Cate H. The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost* 2012;10(7):1207-16.
183. Parry DJ, Al-Barjas HS, Chappell L, Rashid T, Ariens RA, Scott DJ. Haemostatic and fibrinolytic factors in men with a small abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg* 2009;96(8):870-7.
184. Fernandez-Bustamante A, Jimeno A. Disseminated intravascular coagulopathy in aortic aneurysms. *Eur J Intern Med* 2005;16(8):551-60.
185. Siebert WT, Natelson EA. Chronic consumption coagulopathy accompanying abdominal aortic aneurysm. *Arch Surg* 1976;111(5):539-41.
186. Zhang Y, Li C, Shen M, Liu B, Zeng X, Shen T. Aortic aneurysm and chronic disseminated intravascular coagulation: a retrospective study of 235 patients. *Front Med* 2017;11(1):62-7.
187. Sakakibara Y, Takeda T, Hori M, Mitsui T, Ijima H. Disseminated intravascular coagulation in aortic aneurysms: assessment of consumption site using labeled-platelet scintigraphy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1999;47(3):162-5.

188. Hayashi T, Nakagawa N, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H. Rivaroxaban in a patient with disseminated intravascular coagulation associated with an aortic aneurysm: a case report. *Ann Intern Med* 2014;161(2):158-9.
189. Kadohira Y, Yamada S, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, et al. Aortic Aneurysm-associated Disseminated Intravascular Coagulation that Responded Well to a Switch from Warfarin to Rivaroxaban. *Intern Med* 2017;56(21):2913-7.
190. Kawano H, Hata T, Uda A, Maemura K. Use of rivaroxaban for the effective management of disseminated intravascular coagulation associated with abdominal aortic aneurysm. *Intern Med* 2015;54(20):2625-8.
191. Esmon CT. Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. *Thromb Haemost* 2014;111(4):625-33.
192. Bohm A, Flosser A, Ermler S, Fender AC, Luth A, Kleuser B, et al. Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and S1P formation in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2013;99(3):505-13.
193. Spronk HM, de Jong AM, Crijns HJ, Schotten U, Van Gelder IC, Ten Cate H. Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res* 2014;101(3):344-51.
194. Caliskan A, Yavuz C, Karahan O, Yazici S, Guclu O, Demirtas S, et al. Factor-Xa inhibitors protect against systemic oxidant damage induced by peripheral-ischemia reperfusion. *J Thromb Thrombolysis* 2014;37(4):464-8.
195. Ma L, Dorling A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012;34(1):63-72.

196. McEachron TA, Pawlinski R, Richards KL, Church FC, Mackman N. Protease-activated receptors mediate crosstalk between coagulation and fibrinolysis. *Blood* 2010;116(23):5037-44.
197. Mihara K, Ramachandran R, Saifeddine M, Hansen KK, Renaux B, Polley D, et al. Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Mol Pharmacol* 2016;89(5):606-14.
198. Rana S, Yang L, Hassanian SM, Rezaie AR. Determinants of the specificity of protease-activated receptors 1 and 2 signaling by factor Xa and thrombin. *J Cell Biochem* 2012;113(3):977-84.
199. Borensztajn K, Stiekema J, Nijmeijer S, Reitsma PH, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation. *Am J Pathol* 2008;172(2):309-20.
200. Slatter DA, Percy CL, Allen-Redpath K, Gajsiewicz JM, Brooks NJ, Clayton A, et al. Enzymatically oxidized phospholipids restore thrombin generation in coagulation factor deficiencies. *JCI insight* 2018;3(6).
201. Hendel A, Ang LS, Granville DJ. Inflammaging and proteases in abdominal aortic aneurysm. *Curr Vasc Pharmacol* 2015;13(1):95-110.
202. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(5):987-94.
203. Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, Tilson MD. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm disease. *Ann Vasc Surg* 1991;5(3):229-33.
204. Mrowiecki W, Sagan A, Guzik B, Sliwa T, Ignacak A, Mrowiecki T, et al. Inflammatory aortic abdominal aneurysm - immunophenotypic characterization of inflammatory infiltrate. *Arch Med Sci* 2014;10(6):1258-62.

205. 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;101(11):1358-72.
206. Eagleton MJ. Inflammation in abdominal aortic aneurysms: cellular infiltrate and cytokine profiles. *Vascular* 2012;20(5):278-83.
207. Wang X, Gray Z, Willette-Brown J, Zhu F, Shi G, Jiang Q, et al. Macrophage inducible nitric oxide synthase circulates inflammation and promotes lung carcinogenesis. *Cell Death Discov* 2018;4:46.
208. Okayama H, Saito M, Oue N, Weiss JM, Stauffer J, Takenoshita S, et al. NOS2 enhances KRAS-induced lung carcinogenesis, inflammation and microRNA-21 expression. *Int J Cancer* 2013;132(1):9-18.
209. Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, Mueller-Schilling M, Schumacher H, Allenberg JR. Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J Vasc Surg* 2003;38(2):360-7.
210. Ebrahimi S, Rezaei S, Seiri P, Ryzhikov M, Hashemy SI, Hassanian SM. Factor Xa Signaling Contributes to the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *J Cell Physiol* 2017;232(8):1966-70.
211. 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.
212. Bachli EB, Pech CM, Johnson KM, Johnson DJ, Tuddenham EG, McVey JH. Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts. *J Thromb Haemost* 2003;1(9):1935-44.

213. 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.
214. Jiang X, Zhu S, Panetti TS, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex induces activation of the mTOR pathway which regulates migration of human breast cancer cells. *Thromb Haemost* 2008;100(1):127-33.
215. Zhou Q, Bea F, Preusch M, Wang H, Isermann B, Shahzad K, et al. Evaluation of plaque stability of advanced atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice after treatment with the oral factor Xa inhibitor rivaroxaban. *Mediators Inflamm* 2011;2011:432080.
216. Imano H, Kato R, Tanikawa S, Yoshimura F, Nomura A, Ijiri Y, et al. Factor Xa inhibition by rivaroxaban attenuates cardiac remodeling due to intermittent hypoxia. *J Pharmacol Sci* 2018;137(3):274-82.
217. Ichikawa H, Shimada M, Narita M, Narita I, Kimura Y, Tanaka M, et al. Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, Ameliorates Hypertensive Renal Damage Through Inhibition of the Inflammatory Response Mediated by Protease-Activated Receptor Pathway. *J Am Heart Assoc* 2019;8(8):e012195.
218. Dittmeier M, Kraft P, Schuhmann MK, Fluri F, Kleinschnitz C. Pretreatment with rivaroxaban attenuates stroke severity in rats by a dual antithrombotic and anti-inflammatory mechanism. *Thromb Haemost* 2016;115(4):835-43.
219. 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;242(2):639-46.

220. Posthuma JJ, Posma JJN, van Oerle R, Leenders P, van Gorp RH, Jaminon AMG, et al. Targeting Coagulation Factor Xa Promotes Regression of Advanced Atherosclerosis in Apolipoprotein-E Deficient Mice. *Sci Rep* 2019;9(1):3909.
221. Katoh H, Nozue T, Michishita I. Anti-inflammatory effect of factor-Xa inhibitors in Japanese patients with atrial fibrillation. *Heart Vessels* 2017;32(9):1130-6.
222. Eikelboom JW, Connolly SJ, Bosch J, Dagenais GR, Hart RG, Shestakovska O, et al. Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2017;377(14):1319-30.
223. Anand SS, Bosch J, Eikelboom JW, Connolly SJ, Diaz R, Widimsky P, et al. Rivaroxaban with or without aspirin in patients with stable peripheral or carotid artery disease: an international, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2018;391(10117):219-29.
224. Bode MF, Auriemma AC, Grover SP, Hisada Y, Rennie A, Bode WD, et al. The factor Xa inhibitor rivaroxaban reduces cardiac dysfunction in a mouse model of myocardial infarction. *Thromb Res* 2018;167:128-34.
225. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, Bassand JP, Bhatt DL, Bode C, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2012;366(1):9-19.
226. Sanmartin M, Bellmunt S, Cosin-Sales J, Garcia-Moll X, Riera-Mestre A, Almendro-Delia M, et al. Role of rivaroxaban in the prevention of atherosclerotic events. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2019;12(8):771-80.
227. Barrios V, Almendro-Delia M, Facila L, Garcia-Moll X, Mazon P, Camafort M, et al. Rivaroxaban: searching the integral vascular protection. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2018;11(7):719-28.

228. Kim HS, Kim JH, Yim H, Kim D. Changes in the levels of interleukins 6, 8, and 10, tumor necrosis factor alpha, and granulocyte-colony stimulating factor in Korean burn patients: relation to burn size and postburn time. *Ann Lab Med* 2012;32(5):339-44.
229. Niemand C, Nimmesgern A, Haan S, Fischer P, Schaper F, Rossaint R, et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 2003;170(6):3263-72.
230. Laurent M, Joimel U, Varin R, Cazin L, Gest C, Le-Cam-Duchez V, et al. Comparative study of the effect of rivaroxaban and fondaparinux on monocyte's coagulant activity and cytokine release. *Exp Hematol Oncol* 2014;3(1):30.
231. 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.
232. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):461-9.
233. Guzik B, Sagan A, Ludew D, Mrowiecki W, Chwala M, Bujak-Gizycka B, et al. Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2389-96.
234. Miller FJ, Jr. Aortic aneurysms: It's all about the stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(12):1948-9.
235. Lu WW, Jia LX, Ni XQ, Zhao L, Chang JR, Zhang JS, et al. Intermedin1-53 Attenuates Abdominal Aortic Aneurysm by Inhibiting Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36(11):2176-90.

236. Nakahashi TK, Hoshina K, Tsao PS, Sho E, Sho M, Karwowski JK, et al. Flow loading induces macrophage antioxidative gene expression in experimental aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(12):2017-22.
237. Zhang SL, Du X, Chen YQ, Tan YS, Liu L. Potential Medication Treatment According to Pathological Mechanisms in Abdominal Aortic Aneurysm. *J Cardiovasc Pharmacol* 2018;71(1):46-57.
238. Wang YD, Liu ZJ, Ren J, Xiang MX. Pharmacological Therapy of Abdominal Aortic Aneurysm: An Update. *Curr Vasc Pharmacol* 2018;16(2):114-24.
239. Kim HW, Blomkalns AL, Ogbi M, Thomas M, Gavrila D, Neltner BS, et al. Role of myeloperoxidase in abdominal aortic aneurysm formation: mitigation by taurine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;313(6):H1168-h79.
240. Guzik TJ, Harrison DG. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. *Drug Discov Today* 2006;11(11-12):524-33.
241. Spychalowicz A, Wilk G, Sliwa T, Ludew D, Guzik TJ. Novel therapeutic approaches in limiting oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Biotechnol* 2012;13(13):2456-66.
242. Pincemail J, Defraigne JO, Courtois A, Albert A, Cheramy-Bien JP, Sakalihan N. Abdominal Aortic Aneurysm (AAA): Is There a Role for the Prevention and Therapy Using Antioxidants? *Curr Drug Targets* 2018;19(11):1256-64.
243. Emeto TI, Moxon JV, Au M, Golledge J. Oxidative stress and abdominal aortic aneurysm: potential treatment targets. *Clin Sci (Lond)* 2016;130(5):301-15.
244. 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;69(10):523-7.

245. Ishibashi Y, Matsui T, Fukami K, Ueda S, Okuda S, Yamagishi S. Rivaroxaban inhibits oxidative and inflammatory reactions in advanced glycation end product-exposed tubular cells by blocking thrombin/protease-activated receptor-2 system. *Thromb Res* 2015;135(4):770-3.
246. 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;20(3):281-290.
247. Vilaseca M, Garcia-Caldero H, Lafoz E, Garcia-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;65(6):2031-44.
248. 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 24;20(17):4140
249. Cammisotto V, Carnevale R, Nocella C, Stefanini L, Bartimoccia S, Coluccia A, et al. Nox2-mediated platelet activation by glycoprotein (GP) VI: Effect of rivaroxaban alone and in combination with aspirin. *Biochem Pharmacol* 2019;163:111-8.
250. Siu KL, Li Q, Zhang Y, Guo J, Youn JY, Du J, et al. NOX isoforms in the development of abdominal aortic aneurysm. *Redox Biol* 2017;11:118-25.
251. Park Y, Yang J, Zhang H, Chen X, Zhang C. Effect of PAR2 in regulating TNF-alpha and NAD(P)H oxidase in coronary arterioles in type 2 diabetic mice. *Basic Res Cardiol* 2011;106(1):111-23.

252. Elmore JR, Keister BF, Franklin DP, Youkey JR, Carey DJ. Expression of matrix metalloproteinases and TIMPs in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1998;12(3):221-8.
253. Rabkin SW. The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;147:239-65.
254. Maguire EM, Pearce SWA, Xiao R, Oo AY, Xiao Q. Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. *Pharmaceuticals (Basel)* 2019;12(3).
255. Thompson RW, Baxter BT. MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:159-78.
256. Aziz F, Kuivaniemi H. Role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg* 2007;21(3):392-401.
257. Saari H, Suomalainen K, Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171(3):979-87.
258. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 1996;98(11):2572-9.
259. Ejiri J, Inoue N, Tsukube T, Munezane T, Hino Y, Kobayashi S, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker. *Cardiovasc Res* 2003;59(4):988-96.

260. Lizarbe TR, Tarin C, Gomez M, Lavin B, Aracil E, Orte LM, et al. Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN. *Am J Pathol* 2009;175(4):1421-30.
261. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;147:1-73.
262. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, et al. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 1994;75(1):181-9.
263. Xue M, Li G, Li D, Wang Z, Mi L, Da J, et al. Up-regulated MCP1 in abdominal aortic aneurysm is associated with vascular smooth muscle cell apoptosis and MMPs production. *Biosci Rep* 2019;39(11).
264. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, et al. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circ Res* 1997;81(3):448-54.
265. Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, et al. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 2009;76(5):243-52.
266. Gul Utku O, Akbay Karatay E, Erdal H, Arhan M, Onal IK, Ibis M, et al. Rivaroxaban Induces Mucosal Healing in a Rat Model of Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis. *Med Princ Pract* 2015;24(5):470-6.
267. Terry CM, He Y, Cheung AK. Rivaroxaban improves patency and decreases inflammation in a mouse model of catheter thrombosis. *Thromb Res* 2016;144:106-12.

268. Shang J, Yamashita T, Kono S, Morihara R, Nakano Y, Fukui Y, et al. Effects of Pretreatment with Warfarin or Rivaroxaban on Neurovascular Unit Dissociation after Tissue Plasminogen Activator Thrombolysis in Ischemic Rat Brain. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2016;25(8):1997-2003.
269. Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet* 2014;53(1):1-16.

Los resultados recogidos en la presente memoria han dado lugar a la siguiente publicación:

Moñux G, Zamorano-León JJ, Marqués P, Sopeña B, García-García JM, Laich de Koller G, Calvo-Rico B, García-Fernandez MA, Serrano J, López-Farré A: **FXa inhibition by rivaroxaban modifies mechanisms associated with the pathogenesis of human abdominal aortic aneurysms.**

Br J Clin Pharmacol 2017 Dec;83(12):2661-2670. doi: 10.1111/bcp.13383.

