

ESTUDIO DE miRNAs EN LA FORMACIÓN DE ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL EN HUMANOS



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Realizada por:

Laura Gálvez Núñez

Licenciada en Medicina

Dirigida por:

Prof. Manuel Miralles Hernández y Dra. Emma Plana Andani

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA. FACULTAT DE MEDICINA.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA, julio 2021

Programa de doctorado 3139

Don Manuel Miralles Hernández, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de la facultad de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe de Servicio de Angiología y Cirugía Vascolar del *Hospital Universitari i Politècnic la Fe* (Valencia).

Doña Emma Plana Andani, Licenciada en Bioquímica, Doctora en Biotecnología e investigadora de IIS (Instituto de Investigación Sanitaria) La Fe.

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “**Estudio de miRNAs en la formación de aneurismas de aorta abdominal en humanos**”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Licenciada en Medicina Doña Laura Gálvez Núñez, y que se considera apto para su lectura y defensa pública ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, se extiende la presente certificación en Valencia a 29 de julio de 2021.

Firmado por PLANA ANDANI
EMMA - 33465195B el día
03/08/2021 con un
certificado emitido por AC
FNMT Usuarios

Dr. Manuel Miralles Hernández

Dra. Emma Plana Andani

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al Dr. Miralles todos estos años de aprendizaje a su lado y su perseverancia y firmeza, que han sido claves para poder acabar este proyecto.

A la Dra. Plana, por sus conocimientos y sin la cual esta tesis no habría sido posible. Gracias por tu ayuda y por tu paciencia conmigo.

A los pacientes que participaron en este estudio, por su colaboración desinteresada. Al Biobanco IIS (Instituto de Investigación Sanitaria) La Fe, que almacenaron sus muestras para poder desarrollar este estudio.

A mis “señoras” Oriol y Odette por la paciencia y el apoyo moral en estos años de quejas. A Kike, mi compañero de vida. A Carmen, el amor de mi vida, por sufrirme en silencio y aguantarme, sobre todo, estos últimos meses frenéticos.

A los colaboradores en este trabajo. A mi hermano, Ángel, el verdadero científico de la familia, por sus consejos y aportaciones; y en relación con esta tesis, por estas maravillosas ilustraciones, otra de sus grandes aptitudes.

Y, por último, a los más importantes, a mis padres, Ángel y Aquilina, que me han apoyado en todo en esta vida y me han educado inculcándome los valores más fundamentales como son el trabajo, el respeto y la humildad, los que me han llevado a convertirme en la mujer que hoy soy y que me han enseñado que, con esfuerzo, todo se puede.

Resumen de la tesis

Los microRNA (miRNAs/miRs) son pequeñas cadenas de ácido ribonucleico (ARN, del inglés RNA) que regulan diferentes procesos biológicos. El objetivo de este estudio consistió en identificar miRNAs alterados en plasma y tejido de pacientes con aneurismas de aorta abdominal (AAA) y explorar nuevas dianas potencialmente involucradas en su desarrollo. Cincuenta y siete sujetos fueron reclutados para el estudio en plasma (30 pacientes con AAA, 16 voluntarios sanos y 11 paciente con arterioesclerosis). Se testó el nivel de expresión de 179 miRNAs en un subgrupo de las muestras de plasma y, posteriormente, se validaron los miRNAs disregulados en la población completa. Los miRNA alterados también se cuantificaron en el tejido aórtico de 21 pacientes con AAA y en el de 8 donantes de órganos.

Aplicando un set de enriquecimiento de genes se constituyó un mapa de interacciones de miRNAs disregulados y sus dianas, y los objetivos seleccionados se cuantificaron en las muestras de tejido. Detectamos que miR-27b-3p y miR-221-3p aparecían sobrexpresados en el plasma de pacientes con AAA comparándolo con las muestras de los controles sanos 1,6 y 1,9 veces, respectivamente. En el tejido de AAA, 6 miRNA (miR-1, miR-27b-3p, miR-29b-3p, miR-133a-3p, miR-133b y miR-195-5p) aparecieron infraexpresados de 1,6 a 4,8 veces y 4 miRNA (miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-144-3p y miR-103a-3p) aparecieron sobrexpresados de 1,3 a 7,2 veces.

La Trombospondina-2 (THBS2), una diana de miR-195-5p, apareció aumentada en el tejido de pacientes con AAA y se correlacionó negativamente con la expresión de dicho miRNA, lo que sugiere su participación en un mecanismo regulador común.

En conjunto, los hallazgos de este estudio refuerzan el posible papel de los miRNAs en la fisiopatología de los AAA y, aunque su variabilidad, tanto en muestras plasmáticas como tisulares, limita su utilidad como biomarcadores, el estudio de sus dianas potenciales permite descubrir vías de disregulación génica y dianas específicas para su eventual identificación, lo que podría llegar a ser de gran utilidad diagnóstica y terapéutica

Resumen de la tesis (versión en inglés)

microRNAs (miRNAs/miRs) are small chains of ribonucleic acid (RNA) that regulate different biological processes. The objective of this study was to identify miRNAs dysregulated in plasma and tissue of patients with abdominal aortic aneurysm (AAA) and explore new potential targets involved in AAA. Fifty-seven subjects were recruited for a plasma study (30 AAA patients, 16 healthy volunteers and 11 patients with atherosclerosis). The expression level of 179 miRNAs was screened in plasma from a subset of samples, and dysregulated miRNAs were validated in the entire study population. Dysregulated miRNAs were also quantified in aortic tissue of 21 AAA patients and 8 organ donors.

Applying a gene set enrichment analysis, an interaction map of dysregulated miRNAs and their targets was built, and selected targets were quantified in tissue samples. miR-27b-3p and miR-221-3p were overexpressed in plasma of AAA patients compared with healthy controls, 1,6 times and 1,9 times, respectively. In AAA tissue, six miRNAs (miR-1, miR-27b-3p, miR-29b-3p, miR-133a-3p, miR-133b, and miR-195-5p) were underexpressed from 1,6 to 4,8 times and four miRNAs (miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-144-3p, and miR-103a-3p) were overexpressed from 1,3 to 7,2 times.

Thrombospondin-2 (THBS2), a target of miR-195-5p, was increased in AAA tissue and negatively correlated with the expression of miR-195-5p, suggesting their involvement in a common regulatory mechanism.

In global, the findings of this study reinforce the possible role of miRNAs in the physiopathology of AAA and, although their variability (both in plasma and tissue samples) limits their usefulness as biomarkers, the study of their potential targets allows discovering pathways of gene dysregulation and specific targets for their eventual identification, which could be of great diagnostic and therapeutic utility.

Abreviaturas

- AAA: aneurisma de aorta infrarrenal.
- AAS: ácido acetil salicílico.
- AAT: aneurisma de aorta torácica.
- ABCA1: (del inglés) *ATP Binding Cassette A1*.
- ACC: (del inglés) *American College of Cardiology*.
- ACE: (del francés) *Anévrisme de l'aorte abdominale: Chirurgie versus Endoprothese trial*.
- ADAM10: (del inglés) *A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10*.
- ADAMTS-13: (del inglés) *a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin thype 1 motif, member 13*.
- AHA: (del inglés) *American Heart Association*.
- AMI: arteria mesentérica inferior.
- AMS: arteria mesentérica superior.
- Ang II: angiotensina II.
- Angio-TC: angiotomografía computarizada.
- ApoE: apolipoproteína E.
- AT1R: receptor de angiotensina II, tipo 1.
- BB-94: batimastat.
- BCA: ácido bicinconónico.
- BCL6: proteína 6 del linfoma de células B.
- BP: procesos biológicos, (del inglés) *biological processes*.
- CARD10: proteína 10 de reclutamiento de caspasas.
- CC: componentes celulares, (del inglés) *cellular components*.
- CE: (del inglés) *carotid andarterectomy*.

- cDNA: DNA complementario.
- CHI3L1: (del inglés) *quitinasa-3-like protein 1*.
- CMLV: células musculares lisas vasculares.
- CO₂: dióxido de carbono.
- COL: colágeno.
- COL11A1: colágeno XI α 1.
- COX: ciclooxigenasa.
- CT: (del inglés) *cycle threshold*.
- CTL: control.
- CTLA4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico.
- DL: dislipemia.
- DM: diabetes mellitus.
- DNA: (del inglés) *desoxiribonucleic acid*.
- DREAM: (del inglés) *Dutch Randomized Endovascular Aneurysm Management trial group*.
- EAC: enfermedad arterial coronaria.
- EAP: enfermedad arterial periférica.
- EC: estenosis carotídea.
- EEUU: Estados Unidos.
- ELK: (del inglés) *Ets (E twenty-six)-like protein*.
- ELN: elastina.
- ESH: (del inglés) *European Society of Hypertension*.
- ESVS: (del inglés) *European Society for Vascular Surgery*.
- EVAR: (del inglés) *endovascular aortic repair*.
- FBN: fibrilina.
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.
- FLT1: (del inglés) *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1*.
- FRCV: factores de riesgo cardiovascular.

- GO: *Gene Ontology*.
- GSEA: (del inglés) *Gene Set Enrichment Analysis*.
- H: hombre.
- HBPM: heparina de bajo peso molecular.
- HIF: factor inducible de hipoxia.
- HLA: antígeno leucocitario humano (complejo mayor de histocompatibilidad).
- HTA: hipertensión arterial.
- IC: intervalo de confianza.
- ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.
- IECA: inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina.
- IFN: interferón.
- IL: interleucina.
- IRAK1: (del inglés) *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*.
- IRC: insuficiencia renal crónica.
- ITGAV: integrina subunidad $\alpha 5$.
- K2EDTA: sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético.
- KEGG: Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto.
- Kip: proteínas inhibidoras de las quinasas.
- KLF: factor Kruppel-like.
- KMUP: inhibidor de la fosfodiesterasa.
- LAMB3: laminina subunidad 3β .
- LASP1: proteína 1 del dominio LIM y SH3.
- LNA: (del inglés) *locked nucleic acid*.
- LO: lipooxigenasa.
- M: mujer.
- MADH3 / SMAD3: (del inglés) *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3*.

- MAPK/ERK: (del inglés) *Mitogen-Activated Protein Kinases*.
- MASS: (del inglés) *mitral valve aorta-skeleton-skin*.
- MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos M1.
- MEC: matriz extracelular.
- MF: funciones moleculares, (del inglés) *molecular functions*.
- MHz: megahercio.
- miRNA/miRNA/microRNA: (del inglés) micro *ribonucleic acid*.
- MMII: miembros inferiores.
- MMP: metaloproteasa.
- mRNA: RNA mensajero.
- µl: microlitros.
- NADPH: Nicotinamida-Adenina Dinucleotido fosfato.
- ng: nanogramos.
- NKx2.5: proteína homeobox NKx2.5.
- nt: nucleótidos.
- OD: *odds ratio*.
- OVER: (del inglés) *Open versus Endovascular Repair trial*.
- ox-LDL: lipoproteína de baja densidad oxidada.
- PACT: (del inglés) *protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2*.
- PAD: presión arterial diastólica.
- PAGE: (del inglés) *polyacrylamide gel electrophoresis*.
- PAP: complejo plasmina-antiplasmina.
- PAS: presión arterial sistólica.
- PCR: proteína C reactiva.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- PGE: prostaglandina.

- PICP: propéptido carboxiterminal del procolágeno tipo I.
- PIIINP: péptido amino terminal sérico del procolágeno tipo III.
- PLA: fosfolipasa.
- PPE: elastasa porcina pancreática.
- PTEN: proteína homóloga de fosfatasa y tensina.
- PTGS2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2.
- PVDF: polifluoruro de vinilideno.
- p-AAA: plasma de aneurismas de aorta abdominal.
- p-CTL: plasma de controles.
- p-EC/CE: plasma de endarterectomía carotídea.
- RECK: proteína rica en cisteína inductora de reversión por motivos kazal.
- REVA: (del inglés EVAR) reparación endovascular aórtica.
- RG-101: inhibidor mi-122.
- RISC: (del inglés) *RNA-induced silencing complex*.
- RM: resonancia magnética.
- RNA: (del inglés) *ribonucleic acid*.
- ROS: especies reactivas del oxígeno.
- RR: riesgo relativo.
- RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción inversa cuantitativa.
- SDS-Page: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, (del inglés) *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*.
- SEACV: Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascolar.
- SEHH: Sociedad española de Hematología y Hemoterapia.
- SETH: Sociedad española de Trombosis y Hemostasia.

- SMAD2: (del inglés) *SMAD (Mothers Against Decantaplegic) Family Member 2*.
- TBST: (del inglés) *tris-buffered saline*.
- TC: tomografía computarizada.
- TGF: factor de transformación de crecimiento.
- TGFBR: (del inglés) *transforming growth factor beta receptors*.
- THBS2: trombospondina-2.
- TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteasas.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral α .
- TRAF: (del inglés) *TNF receptor associated factor*.
- TVP: trombosis venosa profunda.
- t-AAA: tejido de aneurisma de aorta.
- t-CTL: tejido de controles.
- t-EC/CE: tejido de endarterectomía carotídea.
- UCI: unidad de cuidados intensivos.
- UCP: proteínas de desacoplamiento.
- UK: (del inglés) *United Kingdom*.
- UKSAT: (del inglés) *United Kingdom small aneurysm trial*.
- UTR: (del inglés) *untranslated terminal region*.
- VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.
- VEGFA: factor de crecimiento endotelial vascular.
- VHC: virus hepatitis C.
- VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

Índice

1	Introducción	19
2	Antecedentes y estado actual del tema	21
2.1	Definición de AAA	21
2.2	Histología y composición de la pared aórtica	23
2.3	Historia	27
2.4	Epidemiología	32
2.5	Factores de riesgo	35
2.5.1	Sexo y edad	37
2.5.2	Tabaquismo	38
2.5.3	Hipertensión	39
2.5.4	Arterioesclerosis	39
2.5.5	Historia familiar	41
2.6	Síntomas y diagnóstico	43
2.7	Estudios de cribado/ <i>screening</i>	47
2.8	Tratamiento de los aneurismas	50
2.8.1	Tratamiento farmacológico	51
2.8.2	Tratamiento mediante cirugía abierta	55
2.8.3	Tratamiento quirúrgico endovascular	56
2.8.4	Cirugía abierta vs cirugía endovascular	57
2.9	Patogenia	61

2.9.1	Proteólisis / degeneración de la capa media y metaloproteasas (MMP)	62
2.9.2	Activación/Reclutamiento de macrófagos	65
2.9.3	Inflamación: Citoquinas y otras moléculas inflamatorias	66
2.9.4	Papel de las células musculares lisas vasculares y su regulación (apoptosis)	70
2.9.5	Hipoxia, estrés oxidativo y neoangiogénesis	72
2.9.6	Arterioesclerosis	76
2.9.7	Historia familiar	77
2.10	miRNA	80
2.10.1	Definición	80
2.10.2	Historia de los miRNA	80
2.10.3	Nomenclatura	81
2.10.4	Biogénesis	82
2.10.5	miRNA como reguladores y biomarcadores de patología	86
2.10.6	miRNA en AAA	89
2.11	Perspectivas futuras de los miRNA	102
3	Hipótesis	109
4	Objetivos	111
4.1	Objetivo primario	111
4.2	Objetivos secundarios	111
5	Material y métodos	113

5.1	Diseño y ámbito	113
5.2	Población (selección de pacientes)	117
5.2.1	Estudio en plasma	119
5.2.2	Estudio en tejido	119
5.3	Procesado de muestras	121
5.3.1	Procesado de muestras en plasma	121
5.3.2	Procesado de muestras en tejido	121
5.4	Aislamiento de miRNA	123
5.4.1	Aislamiento de miRNA en plasma	123
5.4.2	Aislamiento de miRNA en tejido	123
5.5	Síntesis de cDNA	125
5.6	Cuantificación de miRNA	127
5.6.1	Cribado en plasma	127
5.6.2	Confirmación de miRNAs disregulados en plasma	128
5.6.3	Cuantificación de miRNAs en muestras de tejido	129
5.7	Cuantificación de proteínas mediante <i>western blot</i>	132
5.7.1	SDS-Page	132
5.7.2	Trasferencia de proteínas	133
5.7.3	Inmunodetección de proteínas	133
5.8	Análisis estadístico de los datos	136
6	Resultados	139
6.1	Cuantificación de miRNA en plasma	139

6.1.1	Etapa de cribado	139
6.1.2	Validación en plasma	144
6.2	Cuantificación de miRNAs en tejido	152
6.3	Identificación de posibles dianas terapéuticas	157
6.4	Cuantificación de las posibles dianas de los miRNAs disreguladas en tejido de pacientes con AAA	161
7	Discusión	165
7.1	Marco teórico actual del papel de los miRNA en la patología aneurismática	165
7.2	miRNA circulantes en plasma	168
7.3	miRNAs en tejido	179
7.4	miRNAs <i>in silico</i>	196
7.5	Limitaciones del estudio	201
7.6	Líneas futuras de investigación	205
8	Conclusiones	207
9	Fondos y premios recibidos para el desarrollo de la actual tesis	209
9.1	Fondos	209
9.2	Premios	209
10	Contribuciones surgidas de esta tesis	211
10.1	Artículos publicados	211
10.2	Presentaciones en congresos	212
11	Bibliografía	215

12	Anexos	257
12.1	Tampones de electroforesis y tinciones	257
12.2	Permisos y autorizaciones	259
12.3	Publicaciones	263
12.4	Premios	266

1 INTRODUCCIÓN

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una patología común y potencialmente letal cuyos mecanismos moleculares aún permanecen inciertos. Como consecuencia, en los últimos años, múltiples estudios han ido encaminados a la investigación de nuevas moléculas relacionadas con la formación y progresión del AAA. Recientemente, se ha relacionado una nueva clase de RNAs de pequeño tamaño, conocidos como microRNA (miR, miRNA), con diferentes patologías cardiovasculares.

El objetivo principal de esta tesis consistió en identificar miRNAs circulantes disregulados en pacientes con AAA para explorarlos como potenciales biomarcadores y evaluar su alteración en muestras quirúrgicas de pared aórtica con la finalidad última de identificar nuevas moléculas que pudieran estar implicadas en la patología aneurismática.

2 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1 Definición de AAA

Los aneurismas se definen como la dilatación, mantenida en el tiempo, del diámetro considerado para la arteria en cuestión por encima del 50% de su dimensión habitual¹. El diámetro normal de la aorta abdominal infrarrenal oscila en torno a 1,2-1,9 cm en mujeres y entre 1,4-2,1 cm, en hombres.

De este modo, las recientes guías para el manejo de los aneurismas de aorta abdominal (AAA) de la Sociedad Europea de Cirugía Vascul ar (*European Society for Vascular Surgery, ESVS*)³ definen el AAA como la dilatación de la aorta abdominal por encima de los 3 cm de diámetro trasverso. Se reserva el término de ectasia para las dilataciones aórticas por debajo de dicho tamaño y el término arteriomegalia para definir la ectasia difusa de la aorta⁴.

Los aneurismas se pueden clasificar, principalmente, según su nivel de afectación (completa o parcial) de sus capas y según su forma. De este modo, los pseudoaneurismas presentan una afectación parcial de la pared arterial, con rotura de la íntima e integridad de la media y la adventicia; mientras que los aneurismas verdaderos afectan a todas las capas de la pared arterial y se diferencian, principalmente por su forma, en aneurismas fusiformes y saculares.

Por otro lado, y según su localización, los AAA se diferencian en suprarrenales, si comienzan por encima de, al menos, una de las arterias renales; pararenales, cuando comienzan a nivel de estas, englobándolas; yuxtarenales, cuando comienzan inmediatamente por debajo, sin afectar a su origen; e infrarenales, cuando se extienden distalmente a las arterias renales.

Los más frecuentes son los de aorta abdominal infrarrenal, afectándose la región suprarrenal tan solo en un 5% de los AAA que se someten a reparación quirúrgica⁵. Si el aneurisma se extiende por encima de la salida del tronco celiaco se denominan toracoabdominales y se dividen en cinco tipos como observamos en la Figura 1, cuatro descritos por el Dr. Ernest Stanley Crawford en 1986⁶ y ampliado con un quinto, descrito por el Dr. Hazim J. Safi en 1999⁷.

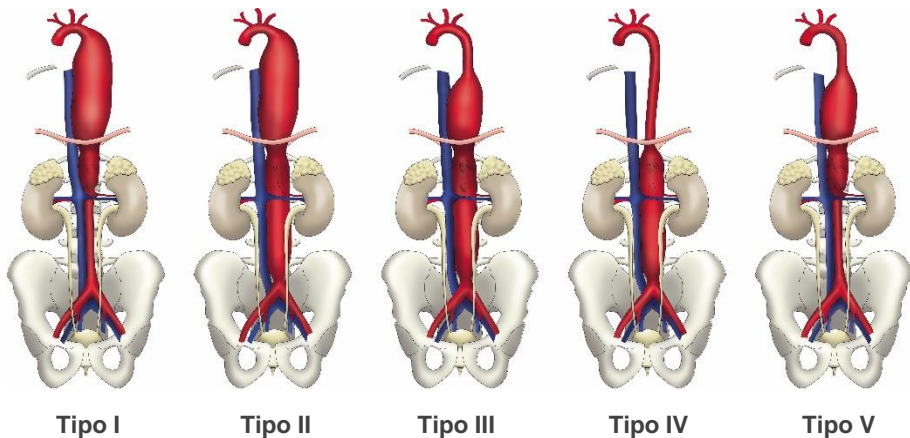


Figura 1. Clasificación de los aneurismas toracoabdominales según Stanley Crawford y Hazim J. Safi^{6, 7}.

2.2 Histología y composición de la pared aórtica

En general, las arterias que presentan mayor elasticidad son las más grandes y próximas al corazón, tales como la arteria aorta o la arteria pulmonar. Su función, fundamentalmente, es transportar y distribuir sangre rica en oxígeno en cada ciclo cardiaco al resto del organismo.

Estas arterias están formadas por tres capas concéntricas: una túnica íntima, una media y una adventicia. Sobre todo, la túnica media y la adventicia contienen una gran cantidad de fibras elásticas, lo que les permite a estos vasos resistir la presión sanguínea generada por el corazón; y de células musculares, que se encargan de mantener la presión cuando los ventrículos cardiacos se distienden en la diástole (efecto *Windkessel*).

La **túnica íntima** está formada por un endotelio, por tejido conectivo subendotelial y una lámina elástica interna. Las células que componen el endotelio (células endoteliales) son planas y alargadas y se disponen en paralelo a la dirección del flujo sanguíneo. Para formar la lámina epitelial, estas células están unidas por *zonulae occludens* y uniones de hendidura. En su citoplasma poseen inclusiones bastoniformes llamadas cuerpos de Weibel-Palade, que son estructuras electrodensas que contienen el factor de von Willebrand y selectina P.

El factor de von Willebrand es secretado por las células endoteliales y, cuando es liberado a la sangre, se une al factor VIII de la coagulación, iniciando la adhesión plaquetaria en el lugar de la lesión. La selectina P es una molécula de adhesión celular que interviene en el reconocimiento neutrófilo-célula endotelial. Tras su fijación, se activa la migración de los neutrófilos desde la sangre hasta el tejido conjuntivo subendotelial.

Las células endoteliales participan en la integridad estructural y funcional de la pared vascular. No sólo proveen una barrera física entre la sangre circulante y los tejidos subendoteliales, sino que también producen agentes vasoactivos que generan la contracción y relajación del músculo liso vascular subyacente.

La **túnica media** es la más desarrollada de la aorta y su elasticidad es la responsable de la distensibilidad de la pared arterial. Se caracteriza por un elevado contenido en tejido conjuntivo/conectivo, así como fibras tanto de colágeno como elásticas, especialmente en las de elevado calibre. El tipo celular principal en esta capa es la célula muscular lisa vascular (CMLV), las cuales se disponen en capas concéntricas, junto con las fibras de colágeno y elastina. También puede haber macrófagos ocasionalmente. En esta capa, la elastina se dispone en forma de láminas fenestradas concéntricas entre las capas de células musculares. Las fenestraciones permiten la difusión de sustancias a través de la pared arterial. La cantidad y el espesor de las láminas se correlacionan con la tensión arterial y la edad. En la etapa perinatal, la aorta tiene muy pocas láminas elásticas, pero en el adulto hay entre 40 y 70. En las personas con HTA aumenta tanto la cantidad como el espesor de éstas.

El componente celular principal, como hemos comentado son las CMLV, que presentan una estructura fusiforme con un núcleo alargado y se encargan de sintetizar el colágeno (tipo I, III y IV), la elastina y las demás moléculas de la matriz extracelular (MEC), como son los proteoglicanos y las glicoproteínas adhesivas. Además, en respuesta a factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), producidos por las células endoteliales, pueden proliferar y migrar hacia la túnica íntima contigua. Esta característica es importante en la reparación normal de la pared vascular y también en procesos patológicos similares a los que ocurren en la aterosclerosis.

La **túnica adventicia** en las arterias elásticas es una capa de tejido conjuntivo relativamente delgada. Suele tener menos de la mitad del espesor de la túnica media y está constituida principalmente por MEC, formada sobre todo por colágeno, que contribuye a impedir la distensión de la pared arterial más allá de los límites fisiológicos durante la sístole del ciclo cardíaco; y por fibras elásticas, que se disponen formando una red fibrilar laxa menos organizada que en la túnica media. Como componentes celulares principales observamos fibroblastos y macrófagos.

Para finalizar, en la capa más externa de las arterias se observan vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) y nervios (*nervi vascularis*). Las ramas de los *vasa vasorum* pueden penetrar parcialmente a la túnica media. La porción interna de la pared recibe los nutrientes desde la luz del vaso.

Todos los componentes anteriormente citados los podemos ver esquematizados en la Figura 2.

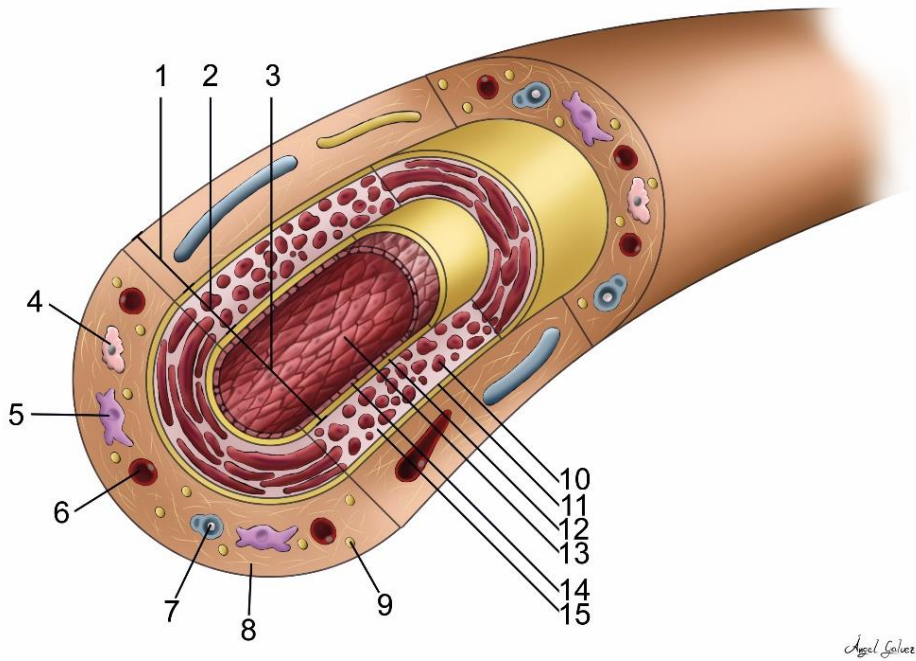


Figura 2. Corte transversal arteria. 1. Túnica adventicia, 2. Túnica media, 3. Túnica íntima, 4. Nervio sin mielina, 5. Fibroblasto, 6. Vasa vasorum, 7. Nervio con mielina, 8. Fibras de colágeno, 9. Fibras elásticas, 10. Célula muscular lisa vascular (CMLV), 11. Membrana elástica externa, 12. Membrana elástica interna, 13. Células endoteliales, 14. Lámina basal, 15. Lamela elástica.

2.3 Historia

La asociación de la aterosclerosis y los aneurismas ya aparece documentada en 1550 a.C. en el “libro de los corazones” de los papiros de Ebers del antiguo Egipto. Por su parte, Galeno (131-200 d.C.) definió por primera vez los aneurismas como masas pulsátiles, distinguiendo ya los aneurismas falsos o traumáticos, de los verdaderos⁸.

A Antyllus (siglo II-III d.C.), cirujano griego que desarrolló su actividad en Roma, se le atribuye la primera descripción del tratamiento quirúrgico de los AAA. Realizó el primer intento de reparación de un AAA mediante ligadura de la aorta por encima y por debajo del mismo, seguido de una incisión para vaciar el saco⁹. Dicho tratamiento se mantuvo vigente hasta el siglo XIX.

Con el auge del conocimiento de la anatomía y de la realización de disecciones anatómicas en el s. XVI, Antoine Saporta (1507-1573), profesor en la Universidad de Montpellier, realizó, en 1554¹⁰, la descripción de un aneurisma de aorta sifilítico. Se cree que es la primera descripción en la historia de esta patología.

Poco tiempo después, en 1555¹¹, Andreas Vesalio (1514-1564) escribió un primer tratado sobre aneurismas, describiendo su diagnóstico y su anatomía. Sin embargo, no confirmó su existencia hasta años más tarde en una necropsia⁸. Giovanni Maria Lancisi (1654-1720), en su libro *De Mortu Cordis Aneurysmatibus*, publicado de forma póstuma en 1728¹², también realizó consideraciones sobre las causas y el desarrollo de los aneurismas e, incluso, los relacionó con causas congénitas.

Sin embargo, hasta el siglo XVIII no se realizaron grandes avances, ni en el conocimiento de la fisiopatología, ni en el tratamiento quirúrgico de los aneurismas. Los hermanos Hunter (John y William) llevaron a cabo varias reparaciones arteriales, aunque el primer cirujano en realizar satisfactoriamente una ligadura de una aorta abdominal fue Astley Cooper (1768-1841), alumno de John Hunter, en un caso de rotura de un aneurisma iliaco en 1817. Sin embargo, el paciente falleció dos días más tarde¹³.

Más adelante, Rudolph Matas (1860-1957) realizó con éxito, en 1888^{14, 15}, la endoaneurismorrafia de un aneurisma postraumático en una arteria humeral. Esta técnica, que consistía en obliterar el saco aneurismático al tiempo que conservaba una luz para el flujo sanguíneo, supuso una importante aportación al tratamiento de los aneurismas¹⁶. También Matas, en 1923¹⁷, logró tratar con éxito un aneurisma de aorta abdominal mediante ligadura del cuello aneurismático a nivel infrarrenal.

A finales del siglo XIX, Alexis Carrel (1873-1944) fue pionero en técnicas anastomóticas y, en 1902, desarrolló las bases de la sutura vascular. Gracias a estas contribuciones, que permitían la reparación de los AAA suturando un injerto desde la aorta proximal a la aorta distal, recibió el premio Nobel de Medicina en 1912¹⁸ por las mejoras y novedades técnicas introducidas.

A lo largo de la historia, se han ensayado muchas otras técnicas, incluyendo la compresión extrínseca, el refuerzo intrínseco del aneurisma con alambres de acero, la electrocoagulación e, incluso, el refuerzo y envoltura con celofán. Esta última técnica se hizo particularmente famosa al ser utilizada por Rudolf Nissen en el tratamiento del AAA de Albert Einstein en 1948¹⁹ y que permitió su contención hasta la rotura que provocó su muerte en 1955²⁰.

Como hemos comentado previamente, aplicando los avances de Carrel, Charles DuBost (1914-1991) realizó la primera sustitución aórtica de un AAA por un homoinjerto de cadáver en 1951²¹ y Ernest Stanley Crawford (1922-1992) llevó a cabo resecciones toracoabdominales con reimplantación de las ramas viscerales^{8, 22}.

Arthur B. Voorhees (1921-1992) desarrolló trabajos experimentales entre 1949 y 1952 para el uso de injertos vasculares de origen sintético. Inicialmente utilizó seda y, posteriormente, otros tipos de láminas textiles. En 1953, inició la aplicación clínica de una fibra sintética hecha de cloruro de polivinilo, llamada *Vinyon-N*²³⁻²⁴, para el reemplazo de la aorta abdominal. Posteriormente, aparecieron otros materiales como el Orlón, el Dacron y el Teflon con diversas mejoras técnicas, materiales que se siguen utilizando en la actualidad.

La era moderna en el tratamiento quirúrgico de los AAA comenzó definitivamente con grandes trabajos de la mano de cirujanos como Michael E. DeBakey (1908-2008) y Denton Cooley (1920-2016) quienes, a principios de los años 50, realizaron la sustitución de una aorta abdominal por un homoinjerto y una resección e injerto de un aneurisma fusiforme de aorta torácica con éxito^{11, 25-27}.

Más recientemente, E. Stanley Crawford (1922-1992) se postuló como una eminencia en el tratamiento de aneurismas toracoabdominales al publicar en 1974²⁸ la reparación de 23 casos consecutivos con buenos resultados.

La reparación abierta de los AAA se ha mantenido prácticamente sin cambios en los últimos 60 años. El avance reciente más importante fue el intento de reparación endovascular de un AAA (REVA) por parte de Nicolay Volodos en 1988²⁹⁻³⁰. Desafortunadamente, una complicación con una oclusión del injerto obligó a la conversión inmediata a cirugía abierta. Sin embargo, Volodos practicó el tratamiento endovascular de un pseudoaneurisma de aorta torácica descendente con éxito mediante una endoprótesis artesanal fabricada sobre un stent cubierto con tela de poliéster, aunque esta aportación no tuvo eco internacional ya que sólo fue publicada en una revista rusa local³¹⁻³², sin repercusión científica internacional.

Finalmente, la gran revolución en el tratamiento de los AAA llegó con los trabajos de Juan Parodi, que inició el tratamiento con endoprótesis de los aneurismas, sobre todo a nivel abdominal, tras realizar la primera reparación satisfactoria con este método en 1991³³, lo que ha supuesto un enorme cambio en el tratamiento y en los resultados actuales de los AAA.

2.4 Epidemiología

Los AAA suponen un importante problema de salud pública. Aproximadamente el 1,7% de las mujeres y el 5% de los hombres mayores de 65 años tienen un diámetro aórtico infrarrenal mayor de 3 cm y la incidencia del aneurisma aórtico aumenta, aproximadamente un 6% por cada década posterior a esa edad. Su prevalencia asciende a un 6% pasados los 80 años³⁴.

En un metaanálisis publicado en 2013³⁵ que incluyó 56 estudios mundiales en población general, se obtuvo una prevalencia global del AAA de 4,6%, siendo del 6% en varones y 1,6% en mujeres, con una prevalencia mayor en el rango de edad entre 65 y 74 años. El análisis por subgrupos de dicho estudio se refleja en la Tabla 1:

Tabla 1. Prevalencia de aneurismas de aorta abdominal (AAA) a nivel mundial.

Prevalencia AAA				
Distribución	América 2,2%	Europa 2,5%	Australia 6,7%	Asia 0,5%
Género	Hombre 6% Mujer 1,6%			
Edad (años)	55-64: 1,3%	65-74: 2,8%	75-84: 1,2%	> 80: 0,6%
Diámetro (cm)	3-3,9: 3,3%	4-4,9: 0,7%	> 5: 0,4%	

En la población española se ha detectado una prevalencia de AAA del 2,3% en hombres de entre 65 y 74 años³⁶; si bien, en estudios anteriores se había descrito una prevalencia ligeramente superior³⁷⁻³⁸. En Europa también se ha observado una disminución en estas cifras, atribuyéndose, al menos en parte, a los programas de cribado implementados en el continente durante la última década, permaneciendo una prevalencia en torno a 1,8-2,6% a los 65 años³⁹. La cifra española se ha mantenido dentro de estos intervalos pese a que en no se han aplicado dichos programas de cribado poblacional, ya implantados e implementados en otros países como Australia⁴⁰⁻⁴¹, Reino Unido (UK)⁴²⁻⁴⁴ y Dinamarca⁴⁵⁻⁴⁶.

Los AAA suponen en torno al 1% de las muertes en hombres por encima de 65 años, ocasionando más de 175000 muertes al año en todo el mundo⁴⁸⁻⁴⁹, lo que supone la 10ª causa de muerte en este grupo de edad⁵⁰.

La tasa de mortalidad asociada a su rotura es muy alta y varía entre el 60-80%⁵¹, por lo que tanto el diagnóstico como el tratamiento precoz son muy importantes antes de la misma. Thompson *et al*⁶² ya mostraron en 2009 el beneficio en cuanto a mortalidad de la realización de programas de detección precoz en hombres entre 65 y 74 años para detectar AAA. Dicho beneficio se mantiene hasta 10 años y la rentabilidad coste-efectiva aumenta con el tiempo.

Recientemente, se ha demostrado que la implantación de sistemas de detección reduce los costes y presentan beneficios en términos de esperanza de vida⁵³. En 2019, Andrew *et al*⁶⁴ publicaron un metaanálisis, en el que se incluyeron 5 estudios con 175085 participantes, en el que se mostraba una reducción significativa y rentable de la mortalidad relacionada con AAA, por lo que se instaba a la implementación más amplia de programas de detección de AAA, incluso en hombres de edad más avanzada.

2.5 Factores de riesgo

Los aneurismas pueden aparecer a cualquier edad como resultado de múltiples factores tanto degenerativos/arterioescleróticos, como inflamatorios, infecciosos, genéticos y/o traumáticos. Suelen asociarse, en alrededor de la mitad de los casos, a hipertensión arterial (HTA) aunque el factor desencadenante más importante implicado hasta la fecha es el tabaquismo. En un estudio de cribado poblacional realizado por Kent *et al*⁵⁵ en 2010 se observó que el 18-25% de los pacientes diagnosticados de AAA pequeños eran fumadores activos⁵⁶.

Otros factores asociados son la hipercolesterolemia, la enfermedad oclusiva vascular periférica / enfermedad arterial periférica (EAP) y la enfermedad arterial coronaria (EAC)⁵⁷. Así mismo, la agregación familiar, sugiere la existencia de una predisposición genética.

Su prevalencia depende de la presencia de picos poblacionales de riesgo incluyendo la edad avanzada (mayores de 65 años), el sexo masculino y la raza blanca.

Desglosaremos uno por uno los factores de riesgo más influyentes en el desarrollo de los aneurismas de aorta. En la Tabla 2 incluimos los más relevantes, recogidos en un metaanálisis de estudios observacionales publicado en 2018 por Altobelli *et al*⁵⁸.

Tabla 2. Factores de riesgo más influyentes en el desarrollo de aneurismas de aorta. OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; HTA: hipertensión; DM: diabetes mellitus; EAC: enfermedad arterial coronaria.

	nº estudios	OR	IC 95%	p-valor
Género	13	5,93	4,26-8,25	< 0,0001
Tabaquismo	6	2,97	1,20-7,30	0,018
HTA	8	1,55	1,02-2,34	0,039
DM	6	1,18	0,99-1,41	0,067
EAC	5	2,29	1,75-3,01	<0,0001
Historia familiar	4	9,64	1,72-53,98	0,01

2.5.1 Sexo y edad

El sexo masculino y la edad avanzada son factores de riesgo no modificables para el desarrollo de AAA. Por debajo de 50 años, la aparición del AAA es poco común y la morbilidad aumenta con la edad. La tasa de prevalencia en pacientes en Estados Unidos (EEUU) es 6 veces mayor en hombres que en mujeres⁵⁹. Asimismo, en diferentes estudios epidemiológicos y de *screening*, como hemos comentado en el apartado anterior, se han observado ratios hombre-mujer que oscilan entre 4,8-5,0:1,0⁶⁰⁻⁶¹.

Sin embargo, la tasa de rotura es hasta tres veces mayor en mujeres y en AAA de menor tamaño, con una tasa de mortalidad similar en ambos sexos⁶². En el *United Kingdom small aneurysm trial* (UKSAT)⁶³ se observó que el diámetro medio de rotura en aneurismas en mujeres fue de 5 cm mientras que, en hombres, fue de 6 cm.

Además, valorando los datos del análisis de resultados de *Medicare* 2006, aproximadamente el 30-34% de los AAA rotos que fallecen en EEUU, ocurren en mujeres, lo que contrasta con el hecho de que sólo el 22,6% de las cirugías electivas de reparación de AAA se realiza en el sexo femenino⁶¹. Así pues, la prevalencia menor de AAA en mujeres se contrarresta por su significativa mayor tasa de rotura⁶⁴.

2.5.2 Tabaquismo

El tabaco es el factor de riesgo modificable más significativo para el desarrollo de AAA. La asociación de la intensidad y la duración del hábito tabáquico en pacientes afectados de AAA es el factor de riesgo más importante para su desarrollo⁵⁶.

En 2018 se publicó un metaanálisis comparando fumadores actuales, exfumadores y fumadores ocasionales respecto a nunca fumadores en el que se observó un riesgo relativo (RR) de 4,48, 2,10 y 3,28, respectivamente. También se observó una relación dosis-respuesta positiva entre la carga tabáquica (cigarrillos-día, paquetes-año) y el riesgo de AAA, mientras que hubo un riesgo reducido al aumentar el tiempo tras el cese tabáquico⁶⁵.

Además, se asocia de manera importante a la morbilidad de los AAA. La persistencia de tabaquismo, una vez establecido el aneurisma, repercute en el aumento de la tasa de crecimiento anual del AAA en torno a 0,4 mm al año, llegando a duplicar el riesgo de rotura⁶⁶. También existe evidencia de la disminución del riesgo tras el cese del consumo⁶⁶, por lo que su interrupción representa uno de los objetivos más importantes a controlar en el manejo médico y en el tratamiento de estos pacientes, para conseguir la reducción del riesgo de crecimiento y la eventual rotura.

2.5.3 Hipertensión

La HTA ha sido reconocida como un factor de riesgo importante para los AAA, aunque suele aparecer más intensamente asociada al desarrollo de la enfermedad coronaria y cerebrovascular, cuando se comparan entre ellas. La morbimortalidad en pacientes con AAA que asocian HTA es mayor que en pacientes sin AAA⁶⁷.

En el metaanálisis publicado en 2019 por Elsa Kobeissi *et al*⁶⁸ observaron que el RR para la presencia de AAA en pacientes hipertensos era de 1,66 veces comparado con el de pacientes normotensos. Además, se registró un aumento del 14% del RR para el desarrollo de AAA por cada aumento de 20 mmHg en la presión arterial sistólica (PAS) y un aumento del 28% por cada 10 mmHg de aumento en la presión arterial diastólica (PAD).

Sin embargo, aún no se conoce completamente cómo la HTA contribuye a la progresión de la enfermedad aneurismática.

2.5.4 Arterioesclerosis

La arteriosclerosis y los AAA comparten factores de riesgo comunes como son la edad avanzada, el sexo masculino o el tabaquismo, entre otros⁶⁹⁻⁷⁰. Esto fue reafirmado por Forsdahl *et al*⁷¹ tras analizar una cohorte de 4345 mujeres y hombres seguida durante 7 años, cuyos resultados concordaban con las publicaciones previas.

En ocasiones, los AAA pueden aparecer en pacientes con arterioesclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, como la enfermedad arterial coronaria o la arteriopatía periférica / enfermedad arterial periférica^{72,73}. Sin embargo, factores de riesgo clásicos en la arterioesclerosis, como son los niveles elevados de colesterol y la HTA, no han sido asociados tan intensamente con la incidencia de AAA⁷²; y factores de riesgo consistentemente asociados, como lo es la diabetes mellitus (DM), no juegan un papel patogénico tan importante en el desarrollo de AAA⁷⁴.

De hecho, la relación entre AAA y diabetes es controvertida. Lederle *et al*⁶⁹ observaron, en un cribado a 73451 hombres, que la detección de AAA mediante ecografía era aproximadamente la mitad en pacientes con diabetes que en no diabéticos. Además, la progresión y el crecimiento de estos AAA era más lenta en paciente con DM, lo que sugiere un mecanismo protector^{35, 75-78}.

En un estudio experimental en modelo de ratón inducido por Angiotensina II (Ang II) se demostró que los niveles elevados de glucemia (hiperglucemia) podrían reducir la progresión de los AAA⁷⁹. Y en un metaanálisis realizado en 2012 por Sweeting *et al*⁶⁶ se observó que los pacientes con diabetes presentaban una tasa de reducción del tamaño del AAA en torno a 0,51 mm al año.

La DM es un factor de riesgo para múltiples enfermedades cardiovasculares, sin embargo, no es un factor de riesgo en el desarrollo de AAA, es más, por el contrario, se asocia negativamente. Esta evidencia podría estar asociada con la terapia con metformina⁸⁰⁻⁸².

Con relación a esta afirmación, Itoga *et al*⁸³ publicaron en 2019 sus resultados tras el análisis de 13834 pacientes y 58833 estudios radiográficos extraídos del sistema de atención médica a Veteranos de EEUU entre 2003 y 2013. Observaron que la tasa media de crecimiento de los AAA fue de $1,2\pm 1,9$ mm/año para los pacientes a los que se les prescribió metformina en comparación con $1,5\pm 2,2$ mm/año para los que no la tomaban, lo que suponía una disminución del 20%. Este efecto siguió siendo significativo cuando se ajustó con las variables relevantes en la progresión de los AAA. De esta forma, concluyeron que la prescripción de metformina se asociaba con una disminución del tamaño del AAA.

2.5.5 Historia familiar

Aproximadamente el 1-5% de los pacientes con AAA tiene una historia familiar asociada. Los primeros en describir este efecto fueron Clift *et al*⁸⁴, en 1977. Posteriormente, Tilson *et al*⁸⁵ recogieron una serie de 50 familias con dos o más componentes de primer orden afectados de AAA. También Borkett-Jones *et al*⁸⁶ en 1988 publicaron la presencia de AAA, esta vez, en gemelos.

Teniendo en cuenta que el 80% de la patología aneurismática aórtica aparece en hombres, esto favorece el aumento del riesgo para sufrir AAA en hermanos y en la descendencia masculina de los pacientes. De hecho, la prevalencia en hermanos puede aumentar hasta un 15-27%⁸⁷.

En 2010 Wahlgren *et al*⁸⁸ publicaron sus resultados tras revisar el registro de gemelos suecos. Había inscritos hasta el momento del estudio 172890 gemelos con una edad media de 72 años, 275 de ellos con AAA.

En este estudio concluyeron que había un 24% de probabilidad de que un gemelo monocigótico de un paciente con AAA, tuviera también la enfermedad. Es decir, un gemelo monocigoto de un paciente con AAA, tenía un riesgo de padecer la enfermedad 71 veces mayor que un gemelo monocigoto de un individuo sin AAA. De este modo, se estimó una tasa de riesgo heredable del 70%, siendo la variabilidad restante explicable por factores ambientales.

Por otro lado, Kitagawa *et al*⁸⁹ también describieron en 2014 la similitud anatómica en dos AAA en sendos gemelos monocigóticos. Además, se ha observado que los casos de AAA familiares tienen un mayor riesgo de rotura que los casos esporádicos⁹⁰⁻⁹¹.

Finalmente, con relación a los factores de riesgo comentados en este apartado, cabe destacar que la relación de algunos de ellos tales como la HTA, la historia familiar, la enfermedad coronaria o la arteriopatía periférica con los AAA podría deberse más a una asociación espuria que a una causalidad o papel conocido en la patogénesis.

2.6 Síntomas y diagnóstico

Generalmente, los AAA son totalmente asintomáticos, por lo que su diagnóstico se puede realizar mediante una exploración física en la que se detecta una masa pulsátil en epigastrio o en área periumbilical, descrita a menudo por los pacientes como una sensación de pulso a nivel abdominal⁹². Sin embargo, lo más frecuente, es que su diagnóstico se realice de manera incidental o casual al realizar cualquier prueba de imagen durante el estudio de otras patologías.

Los AAA pueden tener cualquier tamaño y, en caso de aparecer clínica asociada, (habitualmente, dolor abdominal), no suelen comenzar a hacerlo hasta sobrepasar los 5-6 cm de diámetro y ya en el contexto de alguna complicación grave como es el crecimiento rápido o de magnitudes catastróficas como son la rotura y la hemorragia masiva.

Otros síntomas que pueden presentarse, aunque menos frecuentemente, se asocian al tamaño y aparecen en AAA grandes secundariamente a una clínica compresiva local, lo que los hace muy variados y diversos. Puede aparecer, desde la saciedad temprana, náuseas o vómitos por compresión duodenal; a síntomas urinarios secundarios a hidronefrosis, por compresión ureteral; o trombosis venosa, por compresión venosa iliocava. También puede aparecer dolor lumbar por erosión de la superficie vertebral anterior en las regiones adyacentes al AAA. Incluso sin afectación ósea, los AAA pueden causar lumbalgia crónica o dolor abdominal. Dicha clínica suele ser insidiosa, mal definida y poco específica⁹³.

También, de manera poco frecuente, pueden aparecer síntomas isquémicos agudos, resultado de la embolización distal de los residuos trombóticos (trombo mural) contenidos dentro de los AAA. La trombosis aguda de un AAA ocurre raramente, pero es un evento con consecuencias frecuentemente trágicas. El ateroembolismo es mucho más común que la trombosis aguda de los AAA y ocurren en menos del 2-5% de los pacientes con AAA. No obstante, siempre debe considerarse esta patología como origen de una ateroembolia distal, especialmente en pacientes sin enfermedad oclusiva aterosclerótica manifiesta. Tales síntomas cuando aparecen son, casi siempre, una indicación de tratamiento del AAA mediante reparación quirúrgica.

Independientemente de la sintomatología, el peligro principal del AAA es la rotura, seguida de la hemorragia severa y el shock hemorrágico, con el desenlace fatal para el paciente que esto supone. Una rotura aneurismática se considera una extrema urgencia y, aunque vaya seguida de una intervención quirúrgica para la reparación de esta, consta con una alta tasa de morbimortalidad. Es una de las principales causas de muerte en el mundo (10^a a nivel mundial, como se ha comentado previamente) y es un fenómeno muy complejo que habitualmente ocurre de forma súbita⁹⁴. Presenta una tasa de mortalidad prehospitalaria del 59-83%⁹⁵.

Por otra parte, el riesgo de rotura está relacionado tanto con el tamaño absoluto del aneurisma como con su tamaño en relación con los diámetros normales en función de la ubicación, el tamaño corporal y el género. Otros factores relacionados son la etiología, la tasa de crecimiento y la morfología del aneurisma, que también pueden ser fundamentales para evaluar el riesgo en ciertas circunstancias.

En la práctica clínica, se realiza una monitorización de los AAA para controlar el diámetro máximo y/o su tasa de crecimiento anual o semestral, de manera que se pueda indicar la cirugía profiláctica antes de que exista un alto riesgo de rotura. La intervención quirúrgica se aconseja cuando el aneurisma alcanza 5,5 cm de diámetro transversal máximo y/o crece $>0,5$ cm/año⁹⁶.

El riesgo estimado de rotura anual de los AAA varía en función de su diámetro, siendo muy infrecuente en aortas por debajo de los 4 cm y aumentando posteriormente de modo exponencial, desde una tasa de ruptura del 1% anual para AAA entre 4-5 cm, hasta una tasa del 30-50% de rotura anual para aortas mayores de 8 cm de diámetro transversal máximo⁹⁶.

La tasa de crecimiento de los AAA entre 3-5,5 cm es de 0,2-0,3 cm al año. Los aneurismas de mayor tamaño presentan una tasa de crecimiento mayor⁹⁷⁻⁹⁸. La Tabla 3 muestra el riesgo de rotura de los AAA a los 12 meses según su diámetro máximo⁹⁹.

Tabla 3. Riesgo de rotura de los AAA a 12 meses según su diámetro máximo.

Diámetro de AAA (cm)	Riesgo de rotura (% a 12 meses)
3-3,9	0
4-4,9	1
5-5,9	1-11
6-6,9	10-22
> 7	30-33

Sin embargo, y pesar de un control estricto de estos pacientes, aproximadamente el 10-15% de los aneurismas por debajo del valor umbral comentado anteriormente se rompen¹⁰⁰. Este hecho sugiere la presencia de otros factores asociados al riesgo de rotura, tales como la morfología del aneurisma, la composición y/o la tensión de la pared arterial.

2.7 Estudios de cribado/screening

El beneficio de reconocer la mayor prevalencia de AAA en segmentos identificables de la población repercute en permitir el diseño de programas para el diagnóstico, seguimiento y el tratamiento oportuno de dichas lesiones, reduciendo así la alta letalidad por rotura en casos no diagnosticados. Este efecto ya ha sido comprobado en programas de seguimiento de AAA en otros países, obteniéndose una reducción de la frecuencia de rotura entre 49-55%¹⁰¹⁻¹⁰².

Los programas de detección y seguimiento no sólo reducen la tasa de muertes por rotura, sino que resultan coste-efectivos a largo plazo, considerando el aumento de la expectativa de vida de la población senescente¹⁰³.

Estudios recientes confirman que es posible observar individuos portadores de AAA pequeños, postergando su reparación hasta los 5,5 cm de diámetro sin afectar a su esperanza de vida, siempre y cuando se obtenga una alta adhesión de los pacientes al programa de seguimiento, que exista un rápido acceso a los centros de control y se ofrezca una baja morbilidad operatoria que garantice un beneficio de la intervención terapéutica sobre la historia natural del AAA¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

El eco doppler abdominal es la prueba utilizada para hacer el cribado de AAA, ya que es una técnica no invasiva, inocua, barata, que puede realizarse en centros de atención no especializada y que tiene una sensibilidad y una especificidad en torno al 100% para la detección de esta patología¹⁰⁶. En la Tabla 4 se muestran los principales estudios de prevalencia llevados a cabo mediante cribado poblacional de AAA:

Tabla 4. Prevalencia de AAA detectada en screening poblacional. M: mujeres / H: hombres; UK: Reino Unido; MASS: Multicentre Aneurysm Screening Study; AAA: aneurisma de aorta abdominal.

	Chichester UK	Viborg Dinamarca	Western Australia	MASS UK	Rotterdam Holanda	Tomso, Noruega
N	15775	12628	41000	67800	5419	6386
Género	H y M	H	H	H	H y M	H y M
Edad (años)	65-80	65-73	65-79	65-74	> 55	55-74
Fecha	1988- 1990	1994- 1998	1996- 1998	1997- 1999	1994- 1995	1994- 1995
Publicación	1995	2002	2004	2002	1995	2001
Prevalencia AAA	7,6% H 1,3% M	4,0%	7,2%	4,9%	4,1% H 0,7% M	8,9% H 2,2% M

Finalmente, tras estos resultados, la recomendación en nuestro medio de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascul ar (SEACV)¹⁰⁷ es que el cribado de AAA está indicado y se debe realizar en pacientes con cardiopatía isquémica sintomática, arteriopatía o b literante de miembros inferiores (MMII) y enfermedad ateromatosa carotídea grave.

2.8 Tratamiento de los aneurismas

En general, el tratamiento de cualquier patología se puede dividir en varias fases: preventivo/profiláctico, farmacológico y quirúrgico. Sin embargo, aunque los AAA se pueden diagnosticar y detectar tempranamente a través de programas de cribado, actualmente no existen medios para controlar o frenar su progresión.

La principal causa de muerte de estos pacientes es el riesgo cardiovascular asociado. Por lo tanto, el tratamiento fundamental de los AAA es el control de esos factores de riesgo, de acuerdo con las Guías de Práctica Clínica publicadas en 2019 por el *American College of Cardiology* y la *American Heart Association (ACC/AHA)*¹⁰⁸; y la reparación quirúrgica, ya sea de manera abierta o endovascular. Como hemos comentado en el apartado anterior, la intervención quirúrgica profiláctica de los AAA disminuye la mortalidad si se realiza en individuos sanos cuando el AAA ha alcanzado un diámetro de 5,5 cm^{104-105, 109}.

La mayoría de los AAA se intervienen de manera electiva en fase asintomática para evitar las consecuencias de su rotura. Sin embargo, también pueden intervenir de forma urgente cuando debutan con las complicaciones derivadas de ésta.

Los AAA en rango quirúrgico (>5,5 cm de diámetro máximo) presentan una probabilidad de rotura a 5 años del 25-40%, con una mortalidad global en torno a un 90% en los AAA rotos⁹⁴, si se incluyen los hallazgos de autopsia de los pacientes que no llegan a ingresar en un centro hospitalario (alrededor del 50% perioperatoria). Esto apoya el tratamiento quirúrgico profiláctico como tratamiento de elección cuando se supera el diámetro consensuado.

Existen principalmente dos tipos de intervenciones sobre los AAA. Por un lado, la cirugía convencional abierta, que consiste en la exéresis del aneurisma a través de un abordaje quirúrgico abdominal (por abordaje trans o retroperitoneal) más o menos extenso con su posterior sustitución por una prótesis sintética. Por otro lado, la cirugía endovascular (REVA) que puede constituir una alternativa menos agresiva, en la que no se realiza la resección del aneurisma, sino que éste se excluye mediante la interposición de una endoprótesis cubierta y modular que se coloca a través de abordajes inguinales (desde las arterias femorales), de manera percutánea o con un pequeño abordaje abierto, evitando la apertura de la cavidad abdominal.

2.8.1 Tratamiento farmacológico

Como ya hemos comentado anteriormente, el control de los factores de riesgo es fundamental en el tratamiento del AAA. En concreto, el abandono del hábito tabáquico representa la intervención no quirúrgica más efectiva para reducir el riesgo de complicaciones de los AAA¹¹⁰.

Por otro lado, hay evidencia experimental y clínica de menor crecimiento de AAA con el uso de algunos fármacos. Aunque en algunos casos su efecto ofrece expectativas esperanzadoras, en general, no han demostrado una eficacia suficiente como para aconsejar su uso sistemático.

Los **betabloqueantes**¹¹¹⁻¹¹³ reducen la tasa de dilatación aneurismática a través de la modificación de la fuerza contráctil del miocardio y su impacto en la distensibilidad de la aorta.

La **doxiciclina**¹¹⁴ inhibe la actividad y expresión de las metaloproteasas (MMP) presentes en la pared de la aorta, limitando el crecimiento de aneurismas en modelos animales, aunque su eficacia clínica no ha resultado concluyente.

En cuanto a las **estatinas**, Bellosta *et al*¹¹⁵ demostraron que la fluvastatina era capaz de inhibir la producción de MMP-9 en un 30% en los cultivos celulares de arteria humana y Kalela *et al*¹¹⁶ demostraron que el tratamiento con pravastatina en individuos jóvenes disminuía los niveles de MMP-9 sérica. En esta línea, en 2005, Steinmetz *et al*¹¹⁷ mostraron que el tratamiento con simvastatina disminuía el crecimiento de aneurismas experimentales en ratones normo e hipercolesterolémicos, sin afectarse los niveles de colesterol sérico.

En 2006, en un modelo de AAA experimental en ratas, también se observó que el tratamiento con simvastatina disminuía el desarrollo de AAA y reducía los niveles de MMP-9 y factor nuclear- κ B (un factor de transcripción nuclear involucrado en la expresión de distintos genes durante la inflamación)¹¹⁸. En este estudio se detectó una disminución de la expresión de varios genes relacionados con inflamación, remodelación de la matriz extracelular (MEC) y estrés oxidativo.

Por otro lado, y dado que las MMP desempeñan un papel destacado en el desarrollo de los aneurismas, se ha estudiado el uso de inhibidores sintéticos y su efecto en la disminución del crecimiento de los AAA. El **BB-94** o **batimastat** es un inhibidor de amplio espectro de las MMP que ha sido eficaz en el control de la respuesta inflamatoria y MMP¹¹⁹⁻¹²⁰. En un estudio realizado en 1999 en AAA experimentales inducidos en ratas, el BB-94 disminuyó la expansión del aneurisma. Además, se observó un efecto no sólo como inhibidor directo de las MMP, sino también disminuyendo la respuesta inflamatoria, algo que no se había documentado en los modelos animales tratados con doxiciclina. Este segundo modo de acción podría relacionarse con las alteraciones que tienen lugar en los mecanismos de realimentación de la degradación de la MEC¹²¹. Sin embargo, el empleo a largo plazo del BB-94 se ve limitado por su falta de biodisponibilidad y por la ausencia de posología oral.

El **marimastat**, de segunda generación, sí es activo por vía oral, pero posee un 30% de efectos secundarios, en especial, en el sector musculoesquelético. Se ha estudiado en modelos experimentales humanos de hiperplasia intimal, en extractos de vena safena interna utilizados para bypass y en aneurismas¹²². En este modelo, el marimastat redujo significativamente el engrosamiento de la neoíntima en paralelo a una disminución también significativa de MMP-2 y MMP-9 en el tejido.

Otro grupo de fármacos analizados en el tratamiento de los AAA son los **inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA)**. La administración de IECAs a pacientes con un AAA establecido provoca un aumento de la producción sistémica del colágeno y disminuye el engrosamiento de la pared arterial¹²³. Liao *et al*¹²⁴ demostraron que diferentes IECAs (captopril, lisinopril y enalapril) podían producir una disminución en la degradación de la elastina (ELN) en el AAA de modelos murinos, sin inducir cambios en el estado inflamatorio de la pared. En un estudio poblacional de casos y controles realizado por Hackman *et al*¹²⁵ en 2006 se observó que la administración de IECAs producía una disminución en la tasa de rotura de los aneurismas de aorta, independientemente de la disminución de la tensión arterial.

No obstante, la búsqueda de nuevos fármacos que permitan controlar el crecimiento de los AAA identificados precozmente, sigue constituyendo el santo grial del tratamiento de la patología aneurismática

2.8.2 Tratamiento mediante cirugía abierta

La cirugía clásica, convencional o abierta de los AAA, ha demostrado ser una técnica quirúrgica fiable, segura y duradera, siendo aún en la actualidad el tratamiento de elección, a la espera de estudios prospectivos a largo plazo que la comparen con otras técnicas más novedosas como la terapia endovascular o la laparoscopia⁹⁴. En una revisión realizada por Ernst¹²⁶ en 1993, se examinaron los resultados de mortalidad de la reparación abierta de 6488 aneurismas no rotos recogidos en trece series. El rango varió de 1,4-6,5% con un promedio del 4% (mediana del 3,66%). Los mismos autores analizaron también la mortalidad de 1731 aneurismas rotos, que fue del 23-69%, siendo el promedio del 49%.

Por otro lado, el abordaje quirúrgico del espacio retroperitoneal en el que se encuentra la aorta se puede realizar vía transperitoneal mediante una laparotomía media o, vía directamente retroperitoneal a través de un abordaje del flanco izquierdo del paciente, a nivel subcostal.

Cada técnica presenta sus ventajas y desventajas y sus peculiaridades, por lo que su elección debe ser individualizada a cada paciente. Una revisión de la Cochrane publicada en 2016¹²⁷ comparó ambos métodos y como conclusiones tras su estudio, destacaron que el abordaje retroperitoneal no presentaba ventajas sobre el abordaje transperitoneal para la reparación abierta electiva del AAA en cuanto a la mortalidad, aunque sí podía reducir la pérdida sanguínea, la estancia hospitalaria y la estancia en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

Sin embargo, en un estudio prospectivo randomizado realizado por Darling *et al*¹²⁸ que recogía los resultados de 1109 pacientes comparando el abordaje transperitoneal con el retroperitoneal apreció una diferencia significativa en las pérdidas hemáticas, en la necesidad de transfusión y en la mayor rapidez en inicio de la ingesta oral a favor de la vía retroperitoneal, mostrándose segura y eficiente en comparación con el abordaje transperitoneal clásico.

2.8.3 Tratamiento quirúrgico endovascular

La técnica REVA es menos invasiva que la cirugía abierta. Este procedimiento consiste en la colocación de estructuras modulares estancas confeccionadas a modo de stents cubiertos de tejido impermeable, que se introducen en el territorio aórtico-iliaco a través de ambas arterias femorales comunes. Estas endoprótesis se disponen a modo de bypass intraluminal o “endobypass” para excluir el saco aneurismático de la circulación y, en consecuencia, evitar la presurización directa del AAA, lo que repercute en la drástica disminución del riesgo de rotura.

Para la colocación de la prótesis se utilizan guías de trabajo y de soporte por lo que se debe visualizar todo el procedimiento bajo fluoroscopia directa con rayos X, siendo imprescindible el uso de contraste yodado, lo que puede limitar la utilización de esta técnica en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC)¹²⁹. Sin embargo, se han desarrollado sistemas para realizar fluoroscopias usando dióxido de carbono (CO₂)¹³⁰ como medio de contraste, lo que permite optimizar el tratamiento en estos pacientes.

Esta técnica se trata de un abordaje terapéutico menos agresivo que conlleva menos complicaciones mayores inmediatas intra y postoperatorias en los primeros 30 días respecto a la cirugía convencional, lo que permite tratar a pacientes más longevos y con mayor comorbilidad, que no podrían tolerar una cirugía abierta clásica por su elevado riesgo operatorio¹³¹.

En general, se utiliza un diseño aorto-biiliaco, con reconstrucción modular de la bifurcación aórtica. No obstante, en determinadas situaciones y anatomías aórticas (paciente inestable, accesos dificultosos en uno de los ejes ilíacos, etc.) puede optarse por una endoprótesis aorto-monoilíaca y bypass cruzado entre ambas arterias femorales.

En contraposición a la cirugía aórtica clásica, los REVA requieren un control más exhaustivo que los aneurismas tratados de modo convencional, pues su gran hándicap son las fugas arteriales (*endoleaks*)¹³² en el dispositivo debido a migraciones, desconexiones modulares, porosidad del dispositivo usado y presencia de arterias lumbares y/o arteria mesentérica inferior (AMI) permeables.

2.8.4 Cirugía abierta vs cirugía endovascular

En líneas generales, los resultados del REVA respecto a la cirugía convencional son mejores en cuanto a morbimortalidad quirúrgica inmediata (30 primeros días). Sin embargo, este beneficio se iguala y se pierde con el tiempo. Como se muestra en la Figura 3, la supervivencia en ambos tratamientos a largo plazo, pasados los primeros 30 días perioperatorios, se superpone.

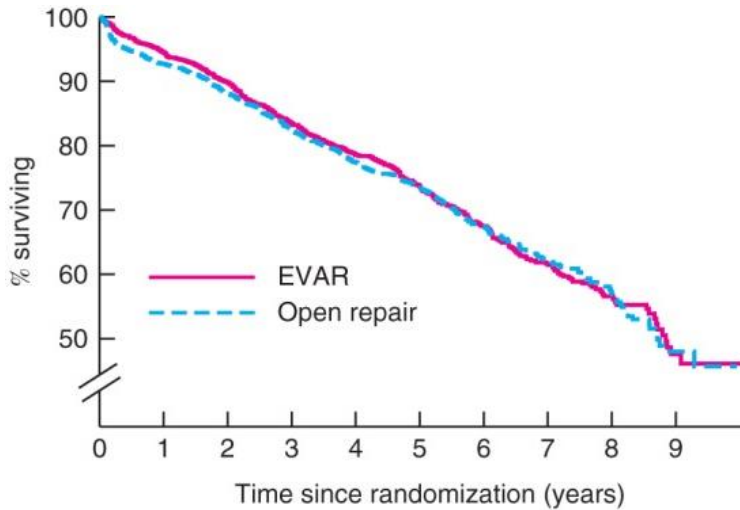


Figura 3. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia para la mortalidad total general, por grupo aleatorizado, para los 2783 pacientes de los 4 ensayos (EVAR-1, DREAM, OVER, ACE). EVAR, del inglés: endovascular aortic repair. Extraída de Powell JT *et al.* On behalf of the EVAR-1, DREAM, OVER and ACE Trialists. Meta-analysis of individual-patient data from EVAR-1, DREAM, OVER and ACE trials comparing outcomes of endovascular or open repair for abdominal aortic aneurysm over 5 years¹³³.

En la revisión sistemática publicada en 2017¹³³ por los componentes de los cuatro ensayos más relevantes en el estudio y seguimiento de AAA (EVAR-1, DRAM, OVER y ACE) se describió el fallecimiento, durante el seguimiento, de 481 pacientes en el grupo REVA y 482 en el grupo de reparación abierta. En general, no hubo diferencia en la mortalidad total durante el periodo de seguimiento de los ensayos. Entre los 0 y 6 meses postoperatorio, la mortalidad sí fue menor para el grupo REVA, con 46 muertes frente a 73 en la reparación abierta y no se describió heterogeneidad entre los ensayos incluidos en la revisión. Sin embargo, a los 5 años, la tasa de supervivencia estimada fue de 73,6% tanto en el grupo REVA como en el grupo de reparación abierta (Figura 3).

Aunque los resultados iniciales de la REVA fueron prometedores, su eficacia a largo plazo respecto a la reparación abierta sigue sin estar clara. Dado que estas son las únicas dos opciones de tratamiento disponible en el manejo del AAA, la duda principal que surge en la práctica clínica es si la REVA o la reparación abierta confieren resultados más favorables a corto y largo plazo en los pacientes con AAA no rotos.

En 2020 se ha publicado un metaanálisis¹³⁴ que incluye 16 estudios, siendo los más relevantes el ACE, el DREAM, el EVAR1, el OVER, el PVSS (Peripheral Vascular Surgery Society), el SAVS (Southern Association for Vascular Surgery), el SwedVasc (Swedish Vascular Registry Trial) y el VSGNE (Vascular Study Group of New England). En esta publicación, la REVA mostró una clara ventaja perioperatoria en comparación con la cirugía abierta. Sin embargo, esta ventaja de supervivencia no se mantiene más allá de los 2 años postprocedimiento. De hecho, las tasas de mortalidad por todas las causas fueron comparables entre los dos grupos de tratamiento a los 2, 4 y 6 años de la cirugía. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad relacionada con el AAA, con el ictus postoperatorio o con el infarto de miocardio, sí que se observó una tasa más alta de complicaciones renales postoperatorias en el grupo de cirugía abierta.

En esta revisión del 2020 se concluyó que era razonable plantear la REVA como una técnica potencialmente revolucionaria tan eficaz como la cirugía abierta, pero que no sería correcto ni válido afirmar que se trata de una intervención superior. De este modo, actualmente, no se puede abogar ni refutar la REVA sobre la cirugía abierta.

En definitiva, en la actualidad, el tratamiento que podemos ofrecer de los AAA ya sea con cirugía convencional o mediante técnicas endovasculares, es un tratamiento tardío y únicamente profiláctico, enfocado a prevenir la muerte o las complicaciones derivadas de la rotura de este. Desafortunadamente, para los pacientes que no tienen indicación quirúrgica, no disponemos, por el momento, de medicamentos eficaces que puedan retrasar o inhibir la progresión del AAA.

Por este mismo motivo, en los últimos años, diversos estudios han ido encaminados a explorar los diferentes mecanismos moleculares implicados en la patología y en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que pudieran ser aplicables tanto para el tratamiento, como para el control de la progresión y la estratificación de los distintos grupos de riesgo.

2.9 Patogenia

Los mecanismos de formación y desarrollo de los aneurismas son complejos e involucran todos los subtipos de células vasculares. Entre ellos destaca la infiltración de células inflamatorias en la capa media y adventicia, la degradación y fragmentación de la elastina, la inflamación intramural, la respuesta inmune, el estrés mecánico de la pared, la degradación de la matriz extracelular y el desequilibrio de la homeostasis de las células del músculo liso¹³⁵.

Además, existen otros fenómenos como la angiogénesis y la formación de placas ateroscleróticas, estrechamente relacionados con la evolución de la patología.

Finalmente, como ya se ha comentado, el componente genético juega un papel importante en el desarrollo del AAA. Existen también algunas enfermedades genéticas que se asocian frecuentemente al desarrollo de aneurismas por defectos congénitos en las proteínas estructurales de la MEC como son el síndrome de Marfan (fibrilina-1), el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV (procolágeno tipo IV) o el síndrome de Loeys-Dietz.

En todos estos mecanismos participan un gran número de moléculas y tipos celulares que, además interaccionan entre sí en un engranaje complejo. A continuación, describimos los fenómenos y elementos involucrados más significativamente en la formación de los AAA.

2.9.1 Proteólisis / degeneración de la capa media y metaloproteasas (MMP)

En la pared arterial predominan los colágenos tipo I y III, así como los macrófagos y las CMLV, que son los tipos celulares que gobiernan el remodelado de la MEC. Otras proteínas que forman parte de la MEC son la fibronectina, la laminina, la elastina y los proteoglucanos¹³⁶. El balance entre síntesis y degradación de la MEC está regulado por el equilibrio entre las proteasas que favorecen la degradación, las MMP, y sus inhibidores tisulares, los TIMP.

Las MMP son una familia de endopeptidasas que utilizan el zinc como cofactor, producidas por diversos tipos celulares (endotelio, músculo liso y monocitos), que degradan numerosos componentes de la MEC y otras proteínas no relacionadas. Las MMP se sintetizan y secretan como proenzimas inactivas y poseen un dominio propeptídico rico en cisteínas, capaz de plegarse e interactuar con el Zn^{++} del dominio catalítico, lo que impide su actividad enzimática. La activación de las MMP requiere la escisión del dominio propeptídico.

Se clasifican en subgrupos basados en su estructura, especificidad por el sustrato y unión a membranas en: colagenasas (MMP-1, 8 y 13), estromalinas (MMP-3, 10 y 11), gelatinasas (MMP-2 y 9), tipo membrana (MT-MMP) y otras (matrilisina, metaloelastasa)¹³⁷. La actividad de las MMP está regulada, dentro y fuera de las células, de 3 formas: transcripcional, postraducciona y a través de interacción con inhibidores específicos.

Dado que las MMP desempeñan papeles clave en condiciones normales de multitud de procesos biológicos, su actividad aberrante ha sido implicada en enfermedades como artritis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, nefritis, trastornos del sistema nervioso central, fibrosis e infección, entre otros¹³⁸.

La capacidad de las metaloproteasas MMP de degradar la matriz extracelular y, por tanto, de regular la integridad y morfología de la pared aórtica ha sido ampliamente estudiada. La disrupción en el balance entre la producción de MMP activas y sus inhibidores (TIMP) puede permitir la acción de dichas MMP, produciéndose una degradación de la MEC¹³⁹⁻¹⁴². En resumen, el balance proteolítico dependerá de la concentración relativa de activadores e inhibidores¹⁴³.

De este modo, el equilibrio entre MMP/TIMP es crítico para el mantenimiento de la integridad del sistema cardiovascular¹⁴⁴⁻¹⁴⁵, lo que ha llevado a proponer que las alteraciones de éste favorecen la degradación de la MEC y contribuyen a la progresión de la aterosclerosis y a la inestabilidad de la placa¹⁴⁶.

Las MMP favorecen la infiltración monocitaria de la pared vascular, de forma que un aumento en la expresión de determinadas MMP, como la **MMP-12**, conlleva una mayor infiltración macrofágica, con rotura de la lámina elástica interna y aceleración del proceso aterosclerótico¹⁴⁷. Además, la inflamación de la pared aórtica producida por los macrófagos también puede activar las MMP¹⁴⁸.

En particular, la inducción y la activación de la **MMP-14 (MT1-MMP)** favorece la invasión del espacio subendotelial por parte de las CMLV y los fibroblastos, un proceso importante en el desarrollo de la hiperplasia intimal, al facilitar la migración y proliferación de estos tipos celulares¹⁴⁹⁻¹⁵⁰.

El papel de las metaloproteasas en la formación y la resolución del trombo aún no se ha definido completamente. Se ha observado que la reducción anormal de la actividad de **ADAMTS-13** (*a desintegrin and metalloproteinase with thrombospondin thype 1 motif, member 13*) favorece la aparición de microangiopatías trombóticas¹⁵¹ y hay evidencias de interacciones moleculares de la **MMP-3** con enzimas, sustratos e inhibidores del sistema fibrinolítico, que indican un papel de las MMP en la regulación de este sistema¹⁵², por lo que podrían desempeñar un papel en diversas enfermedades trombóticas.

Las principales MMP implicadas en AAA son particularmente MMP-9, y en menor medida, -2, -3, -8, -12, y -13¹³⁶. Están relacionadas con esta patología, así como otro tipo de proteasas (cisteín-proteasas y serin-proteasas), estudiadas tanto en modelos animales como en humanos¹³⁵.

La actividad de las **MMP-2 y 9**, entre otras, resulta indispensable para la neovascularización de la placa aterosclerótica, proceso asociado con la vulnerabilidad de las lesiones avanzadas inducido por estímulos proangiogénicos e inflamatorios, y que parece necesario para su crecimiento¹⁵³⁻¹⁵⁴. La MMP-2 se ha visto aumentada en AAA en modelos animales en rata¹⁵⁵, lo que podría explicar su relación en la patogenia de esta patología.

Lindholt *et al*¹⁵⁶ observaron que la MMP-9 se correlacionó significativamente con la tasa de expansión de los AAA, pero no observaron correlación con MMP-2 ni con las metaloproteinasas inhibidoras de tejidos (TIMP) 1 y 2. Hovsepián *et al*¹⁵⁷ encontraron hallazgos similares. Observaron también que las concentraciones plasmáticas de MMP-9 fueron significativamente más altas en pacientes con AAA comparando con pacientes con patología aórtica oclusiva o con pacientes sanos. Sin embargo, no observaron ninguna correlación con el tamaño del AAA.

Por otro lado, un estudio reciente publicado por Fengqi *et al*¹⁵⁸ ha planteado que el Imatinib previene la progresión del AAA inhibiendo la expresión y activación de MMP-9, lo que sugiere una nueva aplicación de este fármaco en la terapia clínica del AAA y la implicación de esta molécula en su desarrollo.

2.9.2 Activación/Reclutamiento de macrófagos

Uno de los fenómenos ampliamente observados en la formación de AAA es la infiltración de macrófagos derivados de monocitos periféricos, los cuales conducen a una inflamación vascular secundaria de la media y la adventicia¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

Estos macrófagos, según el entorno, pueden adquirir diferentes fenotipos (tipo M1 y M2) con distintas funciones biológicas. El tipo **M1** se caracteriza por promover y perpetuar la reacción inflamatoria a través de la producción de citoquinas proinflamatorias, mientras que el tipo **M2** está implicado en la reparación de tejidos¹⁶².

La infiltración por macrófagos de la adventicia se ha observado tanto en modelos animales como en estudios en humanos^{159-161,163-164}. Además, una gran acumulación de macrófagos puede favorecer la expresión de MMP que, como hemos comentado, degradan la MEC provocando un daño en la estructura de la pared arterial que resulta en la dilatación y expansión de las arterias, y en aparición de trombo¹⁶⁵.

2.9.3 Inflamación: Citoquinas y otras moléculas inflamatorias

El papel de la íntima en la formación de los AAA no está claro. Se ha observado que las **células endoteliales** disfuncionales son capaces de secretar también citoquinas inflamatorias que pueden estar implicadas en el desarrollo de enfermedades inflamatorias de la pared arterial¹⁶⁶⁻¹⁶⁷.

También se ha demostrado que la activación de la vía de señalización del **factor de transcripción nuclear endotelial NF-κB** es una señal inicial previa a la infiltración por macrófagos en el proceso de formación de los AAA¹⁶⁸. De esta forma, las células endoteliales aórticas activadas pueden generar la expresión endotelial de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) y proteína de quimiotaxis o quimioatrayente de macrófagos-1 (MCP-1), que reclutarían la migración de células mononucleares hacia las capas subendoteliales de la pared aórtica. Este hecho supondría una infiltración de la pared por macrófagos y una inflamación vascular secundaria de la adventicia y/o de la media^{159-160,169}.

Además, los **mastocitos**, como células inflamatorias, también se han encontrado en la media y la adventicia de manera inicial¹⁷⁰, lo que ha resultado relevante en el diámetro máximo de los AAA¹⁷¹⁻¹⁷². Sun *et al*¹⁷³ publicaron, en 2007, sus resultados en un estudio en un modelo de aorta de rata con perfusión de elastasa en el que observaron que los mastocitos eran promotores de la formación de AAA en dichos modelos. La activación de los mastocitos dio como resultado un mayor crecimiento de los AAA, mientras que su estabilización con cromoglicato disódico disminuyó la formación de AAA. Los estudios mecanicistas demostraron que los mastocitos participaron en la angiogénesis, la apoptosis de las CMLV aórticas y en la expresión de proteasas que degradan la MEC.

Asimismo, los mastocitos pueden liberar citoquinas inflamatorias, quimiocinas, proteoglicanos y proteasas que pueden degradar la MEC, hecho que está estrechamente ligado a la desestructuración de la media, la expansión aórtica, la formación de trombo mural y una eventual rotura de la pared vascular¹⁷⁴.

Por otra parte, los **neutrófilos** parecen jugar un papel importante en la inflamación vascular. Pueden producir elastasas y otras enzimas proteolíticas que debilitarían la pared arterial y que influirían en el desarrollo de AAA¹⁷⁵⁻¹⁷⁶. Se ha demostrado que la depleción de neutrófilos puede bloquear la formación de AAA. Eliason *et al*¹⁷⁷ observaron, en 2005 en un modelo murino de AAA mediante perfusión con elastasa, que los ratones tratados con anticuerpos antineutrófilos presentaban menor aumento de diámetro de AAA que los ratones control, concluyendo que los neutrófilos podían ser un factor importante en la iniciación del proceso de formación de los AAA.

Del mismo modo, los **linfocitos T CD4 +** y los **linfocitos B** juegan un papel importante en la formación de AAA dado que también secretan proteasas que degradan la matriz extracelular y diferentes citoquinas proinflamatorias¹⁷⁸⁻¹⁷⁹. Se ha visto un aumento de los niveles circulantes de **citoquinas proinflamatorias** liberadas por las células Th1 en pacientes con AAA¹⁸⁰⁻¹⁸².

Otro tipo de moléculas inflamatorias que podrían estar relacionadas con AAA en humanos son el factor de necrosis tumoral (TNF- α), la enzima convertidora de TNF- α , la osteoprotegerina, o el factor de transformación de crecimiento (TGF- β)¹⁸³. Sin embargo, cabe destacar que la aplicación de terapias antiinflamatorias e inmunosupresoras pueden tener efectos negativos y, por tanto, han de considerarse con extrema precaución¹⁸⁴.

En esta línea, Juvonen *et al*¹⁸⁵ midieron los niveles circulantes de interleuquina 1 beta (IL-1 β), IL-6, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e interferon-gamma (IFN- γ) en 50 pacientes con AAA, en 42 pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) y en 38 controles. No se encontraron diferencias entre el grupo control y el de enfermedad coronaria. Sin embargo, la enfermedad aneurismática sí se asoció con una elevación de IL-1 beta e IL-6, en hombres y en mujeres, en comparación con el grupo control y el grupo de enfermedad coronaria. El TNF-alfa también se observó elevado en pacientes con AAA, pero más discreta y no estadísticamente significativa.

Por otro lado, el IFN-gamma apareció significativamente aumentado en mujeres con AAA comparado con cualquier otro grupo de hombres o mujeres. Sin embargo, las concentraciones de estas citoquinas no tenían relación con el tamaño del AAA o con el diámetro del trombo mural, aunque la concentración de IFN-gamma mostró una correlación positiva con la expansión del aneurisma. De este modo, concluyeron que los niveles circulantes de citoquinas aumentan en los pacientes con AAA y que el IFN-gamma puede ser un predictor de la tasa de crecimiento o de expansión de los AAA.

Finalmente, los **fosfolípidos**, además de mantener la estructura de la membrana celular, pueden actuar como mediadores de la inflamación y, por tanto, algunas moléculas relacionadas con su síntesis o modificación también se han convertido en objeto de estudio.

Así, se han relacionado con la formación de AAA, entre otras, la 5-lipooxigenasa (5-LO), la ciclooxigenasa (COX), la prostaglandina E2 (PGE2) y sus receptores, o la fosfolipasa-2 (PLA2). Sin embargo, algunos de los estudios muestran resultados contradictorios, lo que parece indicar una relación compleja con la formación de aneurismas, todavía por explorar¹⁸⁶.

2.9.4 Papel de las células musculares lisas vasculares y su regulación (apoptosis)

El papel de las CMLV en los AAA es controvertido. Las CMLV son componentes celulares importantes en la estructura normal de las arterias. Normalmente, estas células presentan un fenotipo contráctil, altamente diferenciado, que es clave para el mantenimiento de la morfología y la función vascular normal.

Bajo ciertos estímulos externos, las CMLV pueden adoptar un fenotipo sintético o proliferativo con mayor capacidad de proliferación, secreción y migración. De esta forma, pueden dirigir la síntesis y reparación de elastina, colágeno y otros componentes de la MEC. La producción de matriz extracelular mediada por CMLVs y la reparación de la media podrían servir para equilibrar la desestructuración proteolítica local que actúa en los AAA. Sin embargo, la proliferación de CMLV, su secreción de matriz extracelular y migración al endotelio es también la base patogénica de la remodelación vascular.

Así, Henderson *et al*¹⁸⁷ estudiaron el tejido aórtico de 20 pacientes intervenidos mediante reparación abierta de AAA y lo compararon con 5 controles. Se observó un número reducido de CMLVs en los AAA. También se detectaron niveles más altos de fragmentación de DNA (ácido desoxirribonucleico) que en los controles y se observó que las paredes de los AAA contenían más células con marcadores de apoptosis que las aortas normales. Las células que mostraban DNA fragmentado eran las CMLV y los macrófagos.

También se observó que las aortas patológicas contenían células T CD4 (+) y CD8 (+), que expresaban mediadores citotóxicos y que no estaban presentes en aorta normales. De este modo, concluyeron que muchas de las CMLV de la túnica media en los AAA presentan marcadores de apoptosis y señales capaces de iniciar la muerte celular. Esto contribuye a la reducción de la celularidad y al deterioro de la reparación y el mantenimiento de la MEC en los AAA. Como consecuencia, se produce una infiltración de la pared enferma por macrófagos y linfocitos T, los cuales pueden producir mediadores citotóxicos que promueven la eliminación de CMLV durante la patogénesis de los AAA.

Por otra parte, el adelgazamiento de la túnica media como consecuencia de la degeneración y muerte de las CMLVs es una característica de las aortas aneurismáticas. La apoptosis determina la celularidad y la morfogénesis de los tejidos provocando, por otra parte, la infiltración de la pared por macrófagos y linfocitos T en la pared de los AAA, como ya hemos comentado.

La apoptosis (o muerte celular programada) de las CMLV se ha ligado a la arteriosclerosis y a la integridad estructural vascular. La apoptosis, mediada por el aumento y la acumulación de p53 (muy conocido por su papel como protooncogén) disminuye la densidad de las CMLVs en la capa media de tejido afectado por AAA comparado con las arterias sanas¹⁸⁸⁻¹⁸⁹.

En un estudio reciente publicado por Chao-HanLai *et al*¹⁹⁰ se ha observado que el inhibidor de la fosfodiesterasa, KMUP-3, frena el crecimiento del AAA posiblemente a través de su interferencia con las vías de señalización implicadas en el cambio fenotípico y apoptosis de las CMLVs. Estos hallazgos proporcionan una validación del concepto de la disfunción de las CMLVs como objetivo terapéutico de los AAA.

2.9.5 Hipoxia, estrés oxidativo y neoangiogénesis

Otro mecanismo patogénico importante en los AAA es el incremento del estrés oxidativo y la producción de **especies reactivas del oxígeno (ROS)**. Este incremento del estrés oxidativo puede inducir una serie de respuestas inflamatorias, las cuales, a su vez, pueden aumentar y potenciar el estrés oxidativo y la estimulación de las proteasas que degradan el tejido conectivo, provocando la apoptosis de CMLVs dando como resultado un daño o lesión tisular¹⁹¹.

Estos fenómenos se han observado tanto en modelos animales como en estudios humanos¹⁹². Se ha detectado un aumento de la producción de ROS, incluyendo anión superóxido, radical hidroxilo y especies reactivas del nitrógeno como el óxido nítrico y el peroxinitrito en lesiones en AAA en humanos, pero no en aortas normales y zonas adyacentes al aneurisma, lo que sugiere que los ROS pueden estar asociados a la degeneración de la pared arterial¹⁹².

En esta línea, Miller *et al*¹⁹³ estudiaron el tejido aórtico de pacientes sometidos a reparación quirúrgica de aorta abdominal. En estas muestras, los niveles de superóxido (medidos por quimioluminiscencia) fueron 2,5 veces más elevados en los segmentos aneurismático que en los segmentos de aorta no aneurismática adyacentes. Los índices de peroxidasa lipídica estaban aumentados en 3 veces en AAA en comparación con los segmentos no aneurismáticos. Además, se observó que el aumento de superóxido en los segmentos de AAA se localizó en las células inflamatorias y en las CMLVs. También la expresión y la actividad de las subunidades nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (**NADPH**) oxidasa p47 y p22 aumentaron en los segmentos AAA en comparación con el control. De este modo, concluyeron que el estrés oxidativo aumenta notablemente en los AAA, en parte, a través de la activación de la NADPH oxidasa y que puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad.

También se ha visto que la generación excesiva de ROS por un lado promueve la expresión de MMP y, por otro, aumenta la apoptosis de las CMLVs de la pared aneurismática¹⁹⁴. De hecho, son necesarios múltiples factores proinflamatorios, incluyendo citoquinas inflamatorias y p53 durante la generación de ROS para que se induzca la apoptosis¹⁹⁵.

Por otro lado, la expresión y actividad de la MMP-9 en la placa aterosclerótica, principalmente asociada con macrófagos, pueden ser una consecuencia del aumento de la producción de anión superóxido NADPH-dependiente, ya que coincide con la expresión de la NADPH oxidasa y la producción de ROS¹⁹⁶.

En contraposición, las **proteínas de desacoplamiento** (UCPs), que pertenecen a la familia de las proteínas transportadoras mitocondriales, entre ellas el subtipo UCP-2, puede ejercer un papel protector en la prevención del desarrollo y la progresión de la arterioesclerosis en los pacientes con niveles aumentados de ROS.

Más recientemente, Yan *et al*¹⁹⁷ observaron en modelo animal *knockout* para el gen UCP-2 que se podría promover la degradación y destrucción de la elastina aórtica y conducir al incremento de la susceptibilidad de los AAA a través de niveles elevados de ROS y la apoptosis de las CMLVs en modelo murino de AAA inducida por Angiotensina II. Este estudio demostró que la deficiencia de UCP-2 aumentó la degradación y destrucción de la elastina aórtica inducida por perfusión de Ang-II, lo que condujo a una mayor susceptibilidad al AAA. Esto nos indica que UCP-2 podría ser un factor antioxidante y antiapoptótico en la regulación de la formación de los AAA.

Kim *et al*¹⁹⁸ observaron que el trasplante de médula ósea de ratones con deficiencia de UCP-2 a ratones con deficiencia de receptor de lipoproteínas de baja densidad aumentaba significativamente el tamaño de la lesión arterioesclerótica. De este modo, estos autores introducen en su revisión el posible papel que UPC-2 puede jugar en la regulación de la aterogénesis a través de la degeneración de las CMLV.

Por su parte, el factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α) es un factor de transcripción que estimula la angiogénesis o reprograma el metabolismo celular para adaptarse a situaciones con disponibilidad reducida de oxígeno¹⁹⁹. HIF-1 α se ha implicado en la patogénesis de la formación de AAA, arterosclerosis e hipertensión pulmonar²⁰⁰. Asimismo, se ha detectado la sobreexpresión de HIF-1 α en el borde de la rotura aneurismática en los tejidos de AAA humano²⁰¹.

Por otro lado, la neoangiogénesis en la capa media es una característica constatada en los exámenes histológicos de los AAA¹⁷⁶, pero cómo este fenómeno, o sus mecanismos desencadenantes conducen y afectan a la rotura de los aneurismas todavía es desconocida. Esta neovascularización de la media implica la degradación proteolítica de la MEC por las MMP para facilitar la proliferación y migración de las células endoteliales.

El papel de la angiogénesis en la patología aneurismática se ha relacionado con un aumento del riesgo de rotura y otras complicaciones asociadas²⁰². En el estudio de Edward Choke de 2006²⁰², citado anteriormente, se evaluó el grado de neovascularización en la rotura de los AAA y la actividad de las MMP de la MEC en el proceso de neovascularización y eventual rotura del AAA.

Choke *et al*¹⁷⁶ investigaron si esa neovascularización aumenta el riesgo de rotura del aneurisma. Para ello estudiaron la pared aórtica de 12 AAA rotos. Se biopsiaron muestras del borde de rotura del aneurisma y se compararon con biopsias de la pared del aneurisma a nivel del saco. Se obtuvieron 10 muestras adicionales control de saco aneurismático de AAA no rotos. Se cuantificaron la neovascularización, el diámetro de los microvasos, el índice de madurez y el infiltrado inflamatorio mediante análisis morfométricos después de la inmunohistoquímica. También se cuantificaron los mediadores proangiogénicos. Los resultados del estudio indicaron un aumento de la neovascularización de la media y la sobreexpresión de citoquinas proangiogénicas el borde de rotura del AAA.

2.9.6 Arterioesclerosis

A mediados del siglo XX se postuló que el desarrollo del AAA aparece como una respuesta patológica frente a la arterioesclerosis aórtica²⁰³. Sin embargo, otras teorías defienden que el desarrollo de la arterioesclerosis y los AAA es completamente independiente. Es decir, que ambas patologías comparten factores de riesgo, por lo que pueden aparecer asociadas, pero que los mecanismos de evolución son ligeramente distintos²⁰⁴.

De hecho, aunque las lesiones arterioescleróticas suelen acompañar a la formación de AAA, puede no existir una relación causa efecto entre ellas. Es más, actualmente no existe evidencia ni epidemiológica ni biológica que refuerce esta teoría^{159, 205-207}.

Aun así, aunque la arterioesclerosis puede no ser una causa directa sobre los AAA, puede iniciar un proceso de reclutamiento de células inflamatorias que activen la primera señal inflamatoria y guíen a los mediadores correspondientes, tales como proteasas o especies derivadas del estrés oxidativo, para la formación de los AAA²⁰⁸.

2.9.7 Historia familiar

Existen también algunas enfermedades genéticas que se asocian frecuentemente al desarrollo de aneurismas como el síndrome de Marfan o el síndrome de Loeys-Dietz. El primero es causado por mutaciones en el gen de la fibrilina 1 (FBN-1) y el segundo, por mutaciones en los receptores del factor de crecimiento transformante β (TGFBR-1, TGFBR-2) o SMAD3 (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog 3*). En ambos casos, se ve alterada la vía de señalización de TGF- β y, como consecuencia, de la pared vascular.

Después de décadas de estudio, parece más plausible que el desarrollo de AAA ocurra como configuración de múltiples factores genéticos predisponentes en relación con ciertos factores ambientales y, en raras ocasiones, se trate únicamente de una predisposición monogenética. Aun así, es conocida la asociación entre los AAA y la variante del brazo largo del cromosoma 16²⁰⁹, pues varios genes candidatos están localizados en esa región.

Además, los AAA están asociados con ciertos isotipos de antígeno leucocitario humano / complejo mayor de histocompatibilidad (HLA)²⁰¹⁻²¹¹. Esto sugiere, que la enfermedad aneurismática resulta, al menos en parte, de factores genéticos que modulan la respuesta inmune.

Otras patologías que pueden asociarse a aneurismas de aorta como afectación sindrómica son los descritos en la Tabla 5²¹².

Tabla 5. Aneurismas aórticos presentes en síndromes hereditarios.

		Gen afectado
Aneurismas de aorta sindrómicos SIN fibrilinosopatías	Síndrome de Loeys-Dietz	mutaciones en TGFBR-1, TGFBR-2 o MADH3
	Síndrome de Ehler-Danlos tipo IV	colágeno tipo 3 (COL3A1)
	Síndrome de Turner	monosomía del cromosoma X (cariotipo 45, X0)
	Síndrome de Beals	fibrilina 2 (FBN2)
	Síndrome de Noonan	PTPN11 (12q24.1); KRAS, SOS1, y RAF1
	Síndrome de Alagille	JAGGED1 (CD339); NOTCH2
	Enfermedad poliquística renal autosómica dominante	PKD1 (16p13.3) PKD2 (4q21-23)
Aneurismas de aorta sindrómicos CON fibrilinosopatías	Síndrome de Marfan	fibrilina 1 (FBN-1)
	Síndrome de Shprintzen-Goldberg	FBN1
	Síndrome de Weill-Marchesani	FBN1
	Fenotipo MASS (mitral valve-aorta-skeleton-skin)	FBN1 (p.Pro1424Ser)
Aneurismas de aorta familiares NO sindrómicos	Aneurisma familiar aórtico	TAAD1, TAAD2 (TGFBR2), TAAD3, TAAD4 (ACTA2), TAAD5 (TGFBR1), TAAD-asociado a ductus arterioso persistente (MYH11 y FAA1)
	Válvula aórtica bicúspide	gen KCNJ2 NOTCH1 (locus 9q34.3)

Como se puede observar, son muchas las líneas de estudio con relación a las posibles moléculas implicadas en la formación del aneurisma de aorta abdominal y su posible utilidad como dianas terapéuticas o marcadores de enfermedad o progresión.

En los últimos años, algunos trabajos se han encaminado hacia el estudio de un nuevo tipo de moléculas, los miRNAs. Estas moléculas se han implicado en los mecanismos moduladores que determinan la evolución en múltiples patologías, tales como: trombosis venosas profundas (TVP)²¹³, aneurismas intracraneales²¹⁴, preeclampsia²¹⁵, respuesta inflamatoria²¹⁶ e inmunológica²¹⁷⁻²²⁰, diabetes²²¹⁻²²³ y obesidad²²⁴⁻²²⁵, entre otras.

Sin embargo, el interés en su relación con la patología aneurismática es más reciente y ha sido escasamente analizado.

2.10 miRNA

2.10.1 Definición

Los miRNAs constituyen un conjunto de pequeños RNA, formados por 19-24 nucleótidos (nt) de cadena sencilla, endógenos, no codificantes y altamente conservados, que regulan la expresión génica al unirse, la mayor parte de las veces, a la región 3' UTR (*untranslated terminal region*) de un RNA mensajero (mRNA) diana mediante el emparejamiento de bases complementarias. Generalmente regulan negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional al inhibir la traducción del mRNA o promover su degradación.

La región de unión miRNA-mRNA abarca un fragmento de secuencia relativamente corta (alrededor de 8 bases) lo que implica que un único miRNA puede unirse a más de 100 mRNA²²⁶.

2.10.2 Historia de los miRNA

Los miRNA fueron descubiertos en 1993 cuando Ambros *et al*²²⁷ observaron durante las pruebas genéticas que estaban realizando para identificar reguladores del tiempo de desarrollo, un gen del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (**lin-4**) que no codificaba ninguna proteína²²⁸.

El gen *lin-4* era necesario para el desarrollo más allá de una etapa larval temprana. Sin embargo, el estudio de su secuencia reveló una secuencia de RNA de 22 nt sin marco de lectura. Este interactuaba con la región 3' UTR de su mRNA, inhibiendo la síntesis proteica de su proteína diana *lin-14*²²⁷⁻²²⁸.

Let-7 fue el primer miRNA identificado en humanos. Se encuentra involucrado en el control del tiempo de desarrollo²²⁹ y, a su vez, se ha observado que está conservado entre las especies²³⁰, lo que sugiere que representan una importante vía reguladora²³¹.

2.10.3 Nomenclatura

La clasificación inicial de los miRNA se refiere a la especie de origen. Por ejemplo, la denominación *hsa* es la relacionada con los miRNA humanos y la *mmu* con los miRNA de ratón. Posteriormente, los miRNA se nombran con el prefijo miRNA o miR seguido de un número:

- El número se relaciona con el momento del descubrimiento. Los descubiertos más recientemente reciben un número más alto.
- Los miRNA con una secuencia casi idéntica se distinguen por una letra minúscula que sigue al número, por ejemplo: miR-29a, miR-29b y miR-29c.

- Por otra parte, algunos miRNAs se transcriben desde dos *loci* genéticos diferentes. Se nominan con un guion seguido de un segundo número, por ejemplo: miR-250-1 y miR-250-2, siendo estos dos miRNAs idénticos.
- Finalmente, un mismo pre-miRNA puede dar lugar a dos miRNAs maduros, que se distinguen por un sufijo 3p o 5p²³², según correspondan al extremo 3' o 5'.

2.10.4 Biogénesis

La biogénesis de los miRNA, sintetizada en la Figura 4, comienza en el núcleo celular con la transcripción. Los miRNAs pueden codificarse en diferentes regiones: intrones, exones o regiones intergénicas²³³⁻²³⁴. La expresión de los miRNAs intergénicos se suele regular por su propio promotor, mientras en el caso de los intrónicos, aunque también pueden presentar su propio promotor, suelen corregularse con el gen en el que se encuentran embebidos²³⁵. Además, pueden expresarse de forma independiente o en grupos, compartiendo el mismo regulador transcripcional²³⁶.

La secuencia de DNA que codifica un miRNA tiene una longitud que supera al tamaño final del propio miRNA e incluye la región del miRNA y una región complementaria a la anterior que permite su unión. Esto conlleva a que, durante la transcripción, se genere una estructura en horquilla formada por un RNA bicatenario primario largo conocido como pri-miRNA, que tiene entre cien y mil nt de longitud²³⁷.

El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas, Drosha en el núcleo y Dicer en el citoplasma. Una vez procesado, una de las hebras del miRNA, se incorpora a un complejo similar al RISC (*RNA-induced silencing complex*).

Drosha es una enzima que pertenece a la clase 2 de las endonucleasas RNasa III. Se encuentra dentro del núcleo y participa en el procesamiento de los pri-miRNA a pre-miRNA. La enzima es un complejo multiprotéico que comprende Drosha y su proteína de unión a dsRNA, Pasha. Dentro del núcleo, el complejo Drosha-Pasha escinde las colas de los extremos del tallo del pri-miRNA²³⁸, para formar una estructura larga de 70 nt denominada miRNA precursor (pre-miRNA)²³⁹. Este es transportado al citoplasma a través del transportador de membrana nuclear Exportina 5 y Ran-GTP289. Una vez que el pre-miRNA se encuentra en el citoplasma, es procesado por Dicer, una enzima clase 3 RNasa III.

Dicer es capaz de reconocer la base de la horquilla del pre-miRNA y corta aproximadamente 20 pares de bases del extremo de la horquilla, eliminando el bucle. Esto deja una secuencia de RNA bicatenario imperfecto miRNA-miRNA de unos 20-25 nt (con un extremo de 2 nucleótidos 3'), conocido como miRNA maduro, como podemos observar en la Figura 4.

Una de estas dos cadenas se unirá a dicho complejo RISC a través de proteína Argonaute 2, que forma parte del RISC. Dicho complejo media la unión con el mRNA diana, que se silencia, bien por el bloqueo de la traducción o bien por la degradación de cadena de mRNA²⁴⁰, dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el mRNA.

En muchos casos, la cadena complementaria del miRNA maduro utilizado se degrada, aunque en ocasiones ambas cadenas son funcionales²⁴¹.

Esta es la ruta de procesamiento más común en la formación de miRNA, aunque se han descrito otros mecanismos alternativos²⁴². Sin embargo, a pesar de las diferencias en el procesamiento, las secuencias de miRNA maduras resultantes tienen típicamente una longitud de 19-26 nt.

Como se ha comentado, los miRNA silencian la expresión génica a través de diferentes mecanismos que dependen, en gran medida del nivel de complementariedad el miRNA y la secuencia de mRNA.

En modelos animales²⁴³⁻²⁴⁵, el método de actuación más común de los miRNAs es la represión traduccional seguido de la desadenilación del mRNA, lo que conduce a la degradación del mRNA y una disminución en la expresión de sus proteínas²⁴⁶.

La represión ocurre inicialmente a través de miRNAs que se unen al mRNA en un complejo con proteínas Argonaute 1-4. Por otro lado, los miRNA causan degradación de la cola de poli (A) (desadenilación) que estabiliza el mRNA, desestabilizándolo y aumentando su degradación.

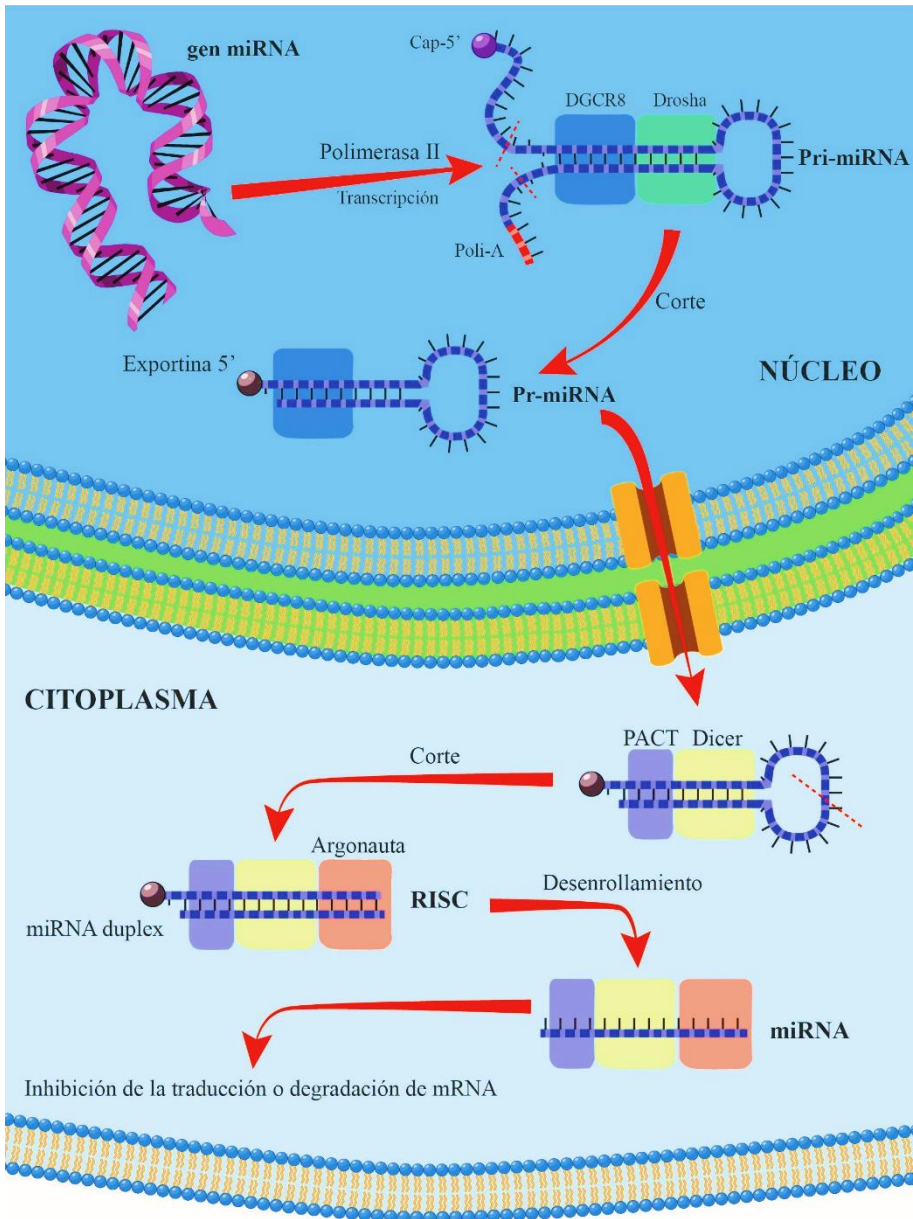


Figura 4. Biogénesis y formación de los miRNAs. miRNA: micro-RNA; PACT: *protein activator of interferon induced protein kinase EIF2AK2*; RISC: *RNA-induced silencing complex*.

2.10.5 miRNA como reguladores y biomarcadores de patología

El *National Institutes Health* definió biomarcador como una molécula con “características objetivamente medibles, capaz de identificar procesos fisiológicos, patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica”²⁴⁷⁻²⁴⁸. Existen diferentes tipos de biomarcadores: diagnósticos, pronósticos o terapéuticos²⁴⁹. El biomarcador ideal debe ser específico, sensible, con posibilidad de determinarlo de manera rápida y económica, sin ser invasivo, estable *in vivo* e *in vitro*, y tener suficiente relevancia preclínica y clínica para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica²⁵⁰.

La identificación de biomarcadores implicados en la patogénesis del AAA haría posible su uso para la inhibición farmacológica del crecimiento del AAA. Estos biomarcadores permitirían estratificar el riesgo y evaluar el grado de enfermedad y, en consecuencia, aplicar un tratamiento adecuado al nivel de enfermedad, para evitar tanto el crecimiento como la rotura del aneurisma.

Aunque se han examinado numerosos marcadores potenciales del crecimiento y rotura del aneurisma, circulantes, biomecánicos y genéticos, ninguno se ha implementado como práctica común en el manejo del AAA²⁵¹.

Por su parte, los miRNA tienen la particularidad de poder detectarse en tejidos o en sangre circulante y son altamente estables durante el almacenamiento, lo que los convierte en potenciales biomarcadores de diagnóstico o pronóstico de diferentes patologías.

En humanos, se conocen actualmente más de 38580 miRNAs (www.mirbase.org; octubre de 2018), y se piensa que son capaces de regular, aproximadamente, el 60% de los genes²⁵².

Algunos de ellos se han visto expresados de manera única en ciertos tejidos humanos en etapas de desarrollo particulares y, por lo tanto, son prometedores como posibles objetos de estudio como nuevos métodos diagnósticos y como terapias farmacológicas. Existe una clara diferencia en la expresión del miRNA maduro entre los distintos tipos de células y tejidos. Numerosos estudios han analizado la abundancia de los miRNA en tejidos específicos, identificando distintos patrones de expresión a nivel de músculo esquelético humano, corazón, próstata, cerebro, hígado, bazo y colon²⁵³⁻²⁵⁵.

Además, algunos miRNAs, parecen ser bastante específicos de un tipo determinado de tejido como el miR-122 en el hígado²⁵⁶ y los miR-1, miR-208 y miR-133 en el músculo o el corazón²⁵⁷. Esto podría ser especialmente útil al señalarlos como potenciales biomarcadores en condiciones agudas como el infarto de miocardio, donde los miRNA específicos del tejido se liberan a la circulación; o en estados de aumento de la proliferación celular, como el cáncer, donde se pueden identificar altos niveles de miRNA circulantes en plasma²⁵⁸⁻²⁵⁹.

Como ya se ha comentado, el mecanismo de las interacciones miRNA-mRNA ocurren a través del emparejamiento de bases complementarias o casi complementarias con el UTR 3' del mRNA, lo que ha permitido desarrollar numerosos algoritmos para predecir los mRNA a los que se dirige cada especie de miRNA. El primer algoritmo de alineación de miRNA fue miRANDA²⁶⁰.

Este programa fue desarrollado por el *Computational Biology Center of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* para identificar dianas genéticas de miRNAs específicos. Desde su introducción, se han desarrollado otros múltiples sistemas de predicción (muchos de los cuales se basan en él), como son el *miRWalk*, *miRecords*, *TargetScan*, *RNA22*, *MicroRNA.org*, *microCosm*, *PITA*, *PicTar*, *Diana-microT*, *miRDB* y *RNAhybrid*; todos ellos con un objetivo común, hacer predicciones para detectar secuencias complementarias como potenciales dianas de miRNAs previamente conocidos. Además de estas herramientas, existen bases de datos de interacciones miRNA-mRNA validadas experimentalmente, como *miRWalk*, *miRTarBase* y *miRecords*, que están vinculadas a *PubMed*.

Sin embargo, como varios miRNA interactúan con un solo mRNA y un solo mRNA puede verse afectado por varios miRNA, el número de posibles interacciones identificadas llega a ser extremadamente alto. Dos algoritmos de predicción (*miRANDA* y *PITA*) han detallado más de siete millones de interacciones entre miRNA y mRNA, por lo que, debido a lo laborioso que resulta evaluar cada interacción predicha, el uso de herramientas de predicción sigue siendo esencial.

Una forma actual de intentar combatir las imprecisiones del *software* de predicción es utilizar múltiples algoritmos de predicción simultáneamente, como se puede hacer con *miRWalk*, y esta combinación de algoritmos mejora la especificidad de los resultados²⁶¹.

Con relación al tema que nos ocupa, se ha observado que los miRNA son moduladores críticos para las funciones de las células vasculares, como la migración celular, la contracción, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. También están implicados en multitud de procesos cardiovasculares, por lo que su posible relación con la formación y el desarrollo del AAA ha suscitado un creciente interés en los últimos años.

2.10.6 miRNA en AAA

Los miRNAs pueden estar implicados en un gran número de procesos biológicos y patológicos como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis o la tumorigénesis²⁶². Como consecuencia, la expresión aberrante o la ausencia de expresión de algunos miRNAs se han asociado a diversos desórdenes fisiopatológicos²⁶³.

En lo referente a enfermedades cardiovasculares, las investigaciones con miRNAs los han relacionado con procesos inflamatorios, angiogénesis, función endotelial, desarrollo cardíaco, miocardiopatías y arritmias, entre otros²⁶⁴. Sin embargo, aún queda mucho por explorar sobre el papel de los miRNAs en patologías vasculares y en particular en la formación de los AAA.

En sucesivos estudios, se han relacionado estrechamente cinco miRNAs (miR-21²⁶⁵, miR-24²²⁰, miR-29b²⁶⁶, miR-712, y miR-205²⁶⁷) con la formación de AAA. Otros miRNAs, como por ejemplo miR-195²⁶⁸, se ha visto que promueve la progresión de los AAA a través de la inhibición de la proliferación y la inducción de la apoptosis en CMLV, lo que sugiere una estrategia terapéutica novedosa para los AAA.

El análisis y estudio del tejido patológico en los estadios finales de la enfermedad ha aportado cuantiosa información sobre los cambios patológicos típicos en los AAA. Sin embargo, aún se carece de información suficiente sobre la iniciación y progresión de la enfermedad.

2.10.6.1 miRNA en AAA de modelos animales

Una familia de miRNAs ampliamente relacionada con los AAA es la miR-29, formada por miR-29a, miR-29b y miR-29c, siendo miR-29b el más estudiado de ellos. En general, se trata de miRNAs relacionados con la respuesta fibrótica y se han asociado a diversas patologías como fibrosis de hígado o riñón, fibrosis cardiaca como respuesta a isquemia miocárdica y esclerosis sistémica²⁶⁹⁻²⁷².

El papel de la **familia miR-29** se ha estudiado en diversos modelos animales, murinos generalmente^{266,273-275}. Algunas de las dianas sobre las que actúa esta familia son transcritos que codifican proteínas de la matriz extracelular como algunas isoformas del colágeno (COLA1, COLA2, COLA3A), ELN (elastina) y fibrilina-1. Además, se ha comprobado, en algunos de estos modelos animales, que la inhibición de miR-29b afecta también a la expresión de MMP-2 y MMP-9. Sin embargo, aunque en todos los estudios mencionados se observó una disregulación de miRNA-29b en tejido patológico, Maegdefessel *et al*²⁶⁶ observaron infraexpresión de dicho miRNA, mientras que otros grupos²⁷³⁻²⁷⁵ observaron sobreexpresión.

Por otro lado, aunque inicialmente **miR-21** se caracterizó como onco-miR, posteriormente se ha visto que es mediador de la proliferación y apoptosis de CMLV, así como de su función contráctil, estando implicada su regulación en desórdenes vasculares.

En lo referente a su implicación en los mecanismos que desencadenan la dilatación aórtica, Maegdefessel *et al*⁶⁵ detectaron un aumento de miR-21 en tejido de pared aórtica de modelo murino con AAA, además de la infraexpresión de una de las dianas de dicho miRNA, PTEN (proteína homóloga de fosfatasa y tensina), una fosfatasa de lípidos y proteínas importantes en la supresión de genes tumorales. La inhibición *in vivo* de miR-21 se traducía en una menor disminución de PTEN y en un aumento de la expansión del AAA, mientras que un incremento de miR-21 tenía efecto protector debido a la hiperplasia de la pared aórtica. Así pues, el aumento de miR-21 en ratones con AAA, parece ejercer un mecanismo compensatorio para tratar de mantener el grosor de la pared.

Por su parte, Cordes *et al*⁷⁶ relacionaron los **miR-145** y **miR-143** (una pareja de transcritos bicistrónicos, originarios de un mismo mRNA) con la elasticidad del músculo liso. Mostraron que estos dos miRNA se cotranscriben en progenitores cardiacos murino-multipotentes antes de localizarse en células de musculo liso. Ambos fueron observados como dianas transcripcionales directas del factor de respuesta sérico, de la miocardina y del Nkx2-5 (proteína homeobox NKx2.5) y se regularon negativamente en vasos lesionados y ateroscleróticos. De este modo, concluyeron que miR-145 puede dirigir el destino del músculo liso y ambos, miR-145 y miR-143, funcionan regulando el fenotipo inactivo vs proliferativo de las células musculares lisas.

En esta misma línea, Elia *et al*²⁷⁷ demostraron que ratones deficientes en la expresión de miR-143 y miR-145 presentaban una alteración de las células del músculo liso y de la homeostasis vascular. Determinaron que la expresión de ambos miRNA está disminuida tanto en el estrés vascular agudo como crónico y que la sobreexpresión de miR-143 y miR-145 disminuyó la formación de neointima en el modelo de rata con lesión vascular aguda. Determinaron que la pérdida de expresión de ambos induce modificaciones estructurales de la aorta debido a una diferenciación incompleta de las CMLV.

En ese mismo año, Boettger *et al*²⁷⁸ y Cheng *et al*²⁷⁹ describieron que miR-143/145 se encontraban disminuidos en diversos modelos de enfermedades vasculares proliferativas vasculares. Ambos se expresaban selectivamente en las CMLV de la pared vascular y su expresión está significativamente regulada a la baja en las paredes vasculares con formación de lesiones neointimales y en CMLV desdiferenciadas, en cultivo celular. De este modo, se observaron como marcadores y moduladores fenotípicos de CMLV capaces de controlar la formación de lesiones vasculares neointimales. Por todos estos motivos, se piensa que la regulación de miR143/145 altera el fenotipo de las CMLV influyendo tanto en el estado sintético/proliferativo como contráctil/diferenciado.

Los **miR-221** y **miR-222** se transcriben de manera conjunta y parecen compartir numerosas dianas. Aunque la mayoría de los estudios sobre estos miRNAs van encaminados a su papel en el desarrollo del cáncer, Liu *et al*⁸⁰ revelaron que estos miRNAs se expresan tanto en células endoteliales como en CMLV y que, además, juegan un papel importante en la regulación de la proliferación de estas últimas y en la formación de la lesión vascular neointimal a través de la modulación de la expresión de sus dianas, las proteínas inhibitoras de las quinasas (Kip1 y Kip2).

Posteriormente, Liu *et al*⁸¹, empleando modelos animales de rata, encontraron disregulados ambos miRNAs al comparar tejido arterial afectado con AAA y tejido arterial sano.

2.10.6.2 miRNA en AAA de humanos

Paralelamente a los estudios en animales, en los últimos años se han desarrollado estudios sobre el papel de los miRNAs en AAA humanos. De este modo, en 2012, Pahl *et al*⁸², publicaron el primer trabajo sobre expresión diferencial de miRNAs en aneurisma aórtico abdominal en humanos. En él, comparaban el patrón de expresión de miRNAs en tejido de aorta abdominal afectado por aneurisma.

De este modo, hallaron sobreexpresión de **miR-21** en pacientes con AAA, frente a controles, cuando las muestras eran analizadas mediante *arrays* de expresión. Sin embargo, no fueron capaces de validar estos resultados mediante PCR cuantitativa en tiempo real RT-qPCR y, aunque sí fueron capaces de detectarlo y cuantificarlo, no observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Además, estos mismos autores validaron, en el mismo estudio, otros 5 miRNAs (miR-30c2*, miR-204, miR-133a, miR-133b y miR331-3p) con claras diferencias de expresión entre pacientes, y controles sanos. Asimismo, predijeron un total de 222 mRNA dianas, de los cuales, un gran porcentaje están involucrados en apoptosis y activación celular.

Por su parte, Jones *et al*²⁸³, Boon *et al*²⁷³ y Liao *et al*²⁶³, estudiaron la regulación de la familia **miR-29** en los aneurismas de aorta torácica (AAT), con resultados discrepantes.

Inicialmente, Jones *et al*²⁸³ identificaron a MMP-2 como objetivo potencial de miR-29a y posteriormente se verificó *in vitro*. Además, observaron una relación inversa entre los niveles de miR-29b y la MMP-2 total en las muestras clínicas de AAT.

En contraposición a los anteriores, Boon *et al*⁶⁷³ observaron que el aumento de la expresión de los miembros de la familia miR-29 se asociaba con una regulación a la baja de numerosos componentes extracelulares de la MEC en aortas de ratones de edad avanzada, lo que sugería que esta familia contribuye a la pérdida de MEC sensibilizando así la aorta para la formación de aneurismas. Este aumento de miR-29 también se observó en biopsias de aneurismas torácicos obtenidas de pacientes con válvulas aórticas bicúspides o tricúspides.

Finalmente, el grupo de Liao *et al*⁶⁶³, también observaron una infraexpresión en los miRNA de la familia miR-29. Previeron que esta familia de miRNAs se dirige a los genes relacionados con el colágeno, lo que puede sugerir un papel importante en el desarrollo de la disección de aorta torácica. La falta de esta familia de miRNAs conduce al aumento de depósito de colágeno y contribuye a la enfermedad.

Recientemente, Maegdefessel *et al*⁶⁶⁶ observaron que, en humanos, la expresión aórtica de miR-29b en pacientes con AAA era menor que en donantes sanos, mientras que se detectaba el efecto contrario en la expresión de los genes codificadores de colágeno COLA1, COLA2, COLA3 y ELN, que son dianas validadas de dicho miRNA.

En dos de los trabajos de Maegdefessel *et al*⁶⁵⁻²⁶⁶ contrastaron en tejidos humanos sus resultados obtenidos en modelos animales y se observó disregulación tanto de **miR-21** como de miR-29b al comparar tejido patológico con tejido sano. Dichos trabajos, corroboran sus resultados al encontrar sobreexpresado miR-21 en tejido aórtico de pacientes sometidos a cirugía abierta frente a tejido de donantes sanos.

Por el contrario, Kin *et al*²⁰³ observaron en 2012 una disminución de miRNA-29b en tejido patológico y en plasma de pacientes con AAA, comparado con tejido sano y plasma de pacientes sometidos a cirugía valvular. Observaron la misma tendencia al comparar el plasma del grupo control patológico, constituido por pacientes con enfermedad coronaria. También validaron, en ese mismo estudio, la disregulación de miR-155 en humanos y observaron un claro aumento de expresión de este miRNA en pacientes con AAA comparado con controles sanos.

Por otro lado, al comparar tejido de pacientes con AAA y tejido de aorta ascendente de pacientes sin patología arterial sometidos a reemplazo valvular, encontraron que el tejido patológico presentaba mayor expresión de algunos miRNAs específicos de células endoteliales, así como relacionados con fibrosis o inflamación (let-7f y miR-20a, -21, -27, -223, -92a, -126, 124a y los ya mencionados miR-221, -222, -155, -146a y -29b).

También observaron disregulación de miRNAs relacionados con procesos inflamatorios y encontraron correlación entre estos miRNAs y la concentración de algunas moléculas inflamatorias como la proteína quimioatrayente de los M1 (MCP-1), TNF- α o TGF- β . Finalmente, validaron la regulación de la pareja de **miR-221/222** encontrándolos significativamente más expresados en tejido patológico que en tejido sano.

Por otra parte, la regulación de **miR-143/145** podría estar mediada por su interacción con algunos factores de transcripción de proteínas como el KLF4, KLF5 (factor Kruppel-like) o ELK-1 (*Ets (E twenty-six)-like protein*). En uno de los primeros trabajos en los que se determinaban estos miRNAs en humanos, Elia *et al*²⁷⁷, observaron una disminución de miRNA 143/145 en pacientes con aneurisma de aorta torácica. Sin embargo, Kin *et al*²⁰³, no fueron capaces de reproducir estos resultados en el caso de aneurisma de aorta abdominal.

La posible relación entre el **miR-155** y el desarrollo de AAA ha suscitado interés debido a su efecto en el sistema renina/angiotensina y, por tanto, su relación con los procesos inflamatorios. Por un lado, una de las dianas de miR-155 es el receptor de angiotensina AT1R, de modo que la migración de células endoteliales mediada por angiotensina II se ve afectada por la disregulación de dicho miRNA.

Por otro lado, la sobreexpresión de miR-155 disminuye la expresión de Ets-1 (homólogo 1 del oncogén v-ets de eritroblastosis del virus E-26) que tiene como consecuencia la regulación de algunas moléculas inflamatorias como VCAM-1, MCP-1 o FLT-1 (*Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1*), afectando también a la adhesión de linfocitos a células endoteliales²⁸⁴. Otras dianas de este miRNA-155 son el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA4) y SMAD2, también relacionadas con respuesta inmune.

Aunque en un principio estos estudios sugieren un papel antiinflamatorio de miR-155, estudios posteriores muestran discrepancias en lo que se refiere a la función de dicho miRNA. Así pues, mientras Nazari-Jahantigh *et al*²⁸⁵ describieron dicho miRNA como inductor de la aterosclerosis a través de la represión de Bcl6 (proteína 6 del linfoma de células B) en macrófagos, en ese mismo año, Donners *et al*²⁸⁶ sugirieron que la deficiencia hematopoyética de miR-155 en ratones aumenta el tamaño y la inestabilidad de la placa de ateroma.

Por su parte, Biros *et al*²⁸⁷, identificaron miRNAs diferencialmente expresados al comparar la zona de máximo diámetro del AAA con el cuello, no dilatado. De este modo, el emparejamiento caso control no se veía afectado por factores de riesgo o medicación, que podrían alterar la expresión de miRNAs. En este trabajo, analizaron 126 miRNAs de los cuales 7 se veían alterados por la presencia de la lesión (miR-155, -28, -30a-3p, -150, -302b*, -93, -99a). Entre ellos, el miRNA con mayor diferencia de expresión en tejidos, resultó ser miRNA-155, que como ya se ha comentado, está relacionado con la respuesta inmune y cuyas dianas, CTLA4 y SMAD2, aparecieron disreguladas entre tejido afectado y tejido sano.

En 2014, Cheuk *et al*²⁸⁸, publicaron un estudio en el que separaban únicamente las células vasculares del músculo liso de la capa media de pacientes con AAA y de donantes sanos y estudiaban los miRNAs regulados en cultivos de dichas células. De este modo, detectaron dos miRNAs con mayor disregulación, **miR-516a** y **miR-1260**, el primero sobreexpresado y el segundo infraexpresado en explantes de AAA. Los niveles de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA) e IL3 (que resultaron dianas predichas de miR-516a) secretados al medio de cultivo fueron mayores en el caso de explantes de AAA que en el caso de explantes de aorta normales. Por su parte, los niveles de COL1A (potencial diana de miR-1260) se vieron aumentados en el cultivo de tejido de explantes de AAA.

2.10.6.2.1 miRNAs circulantes como biomarcadores de crecimiento de AAA

La identificación de biomarcadores implicados en la patogénesis del AAA haría posible su uso para la inhibición farmacológica del crecimiento del AAA. Estos biomarcadores permitirían estratificar el riesgo y evaluar el grado de enfermedad y en consecuencia aplicar un tratamiento adecuado al nivel de enfermedad, para evitar tanto el crecimiento como la rotura del aneurisma.

Estudios recientes han demostrado la utilidad de los miRNA presentes en plasma o suero como marcadores de diagnóstico y pronóstico de diversas patologías. Tanto la facilidad de obtención de los fluidos, como la probada estabilidad de estos miRNAs circulantes²⁸⁹ los han convertido en objeto de interés, aunque su uso como biomarcadores también presenta ciertos inconvenientes. Por un lado, la baja concentración de este tipo de moléculas en fluidos dificulta su determinación y, por otro, debido a que los estudios con miRNAs son relativamente recientes, todavía no existe un consenso claro sobre la metodología, la normalización de los resultados y la especificidad de estos, lo que hace que, aunque su potencial como biomarcadores sea prometedor todavía haya que tratarlos con rigor y cautela y aún se requieran más estudios que los consoliden como tales.

En lo que se refiere a patologías cardiovasculares, la mayoría de los estudios son ensayos piloto realizados en un número relativamente pequeño de muestras. Aun así, se han relacionado algunos miRNAs en plasma, suero o sangre total con patologías como infarto agudo de miocardio, fallo cardiaco, enfermedad arterial coronaria, diabetes mellitus, infarto cerebral, hipertensión esencial o embolismo agudo de pulmón²⁹⁰.

En el caso del aneurisma de aorta abdominal, existen muy pocos trabajos publicados al respecto. El primer estudio publicado fue el de Kin *et al*²⁰³, en el que los autores observaron un patrón de expresión diferencial de miRNAs circulantes entre pacientes con AAA y controles sanos, que incluían miR -15a/b, -29, -124a, 126, -146 a, -155 y -223. Curiosamente los miRNAs que se habían observado sobrepresados en tejido patológico, aparecían infraexpresados en plasma de pacientes, atribuyéndolo a que, tal vez, esos miRNAs eran captados en la zona de la lesión y, por eso, disminuía su concentración circulante.

2.11 Perspectivas futuras de los miRNA

Una de las ventajas de los miRNAs y su participación en patologías vasculares es su papel como potenciales dianas terapéuticas o biomarcadores de enfermedad. La capacidad de un solo miRNA de regular múltiples dianas de patologías complejas hace que, a diferencia de otras dianas clásicas, se puedan regular redes funcionales completas modulando un único miRNA.

La regulación *in vivo* de la expresión de los miRNA puede aumentarse con el empleo de un mimic-miR o un pre-miRs o bien inhibirse con antimiRs (antagomiRs/*blockmirs*), siendo este último medio de regulación el más estudiado. Los antimiRs son oligonucleótidos antisentido formados por la secuencia reversa, parcial o total, del miRNA que se quiere bloquear. Este tipo de moléculas consisten en oligonucleótidos antisentido diseñados químicamente, con metilación del oxígeno 2' y conjugados a una molécula de colesterol para facilitar la absorción celular. La disminución del miRNA diana tiene como consecuencia un aumento de la expresión de las proteínas que antes bloqueaba dicho miRNA. Para asegurar la introducción en las células, la rápida eliminación y la estabilidad y la especificidad, estos oligonucleótidos han de someterse a diversas modificaciones químicas.

En 2005, Krutzfeldt *et al*²⁹¹ describieron el empleo, por primera vez *in vivo*, de los llamados **antagomiRs**. Desde entonces, la capacidad de los antagomiRs para disminuir la expresión de los miRNAs y por tanto, aumentar la de sus dianas, se ha demostrado en múltiples modelos animales²⁹².

Además de los antagomiRs, se han diseñado otros antimiRs con otro tipo de modificaciones químicas, siendo uno de los más populares en los últimos años los **LNA** (ácidos nucleicos bloqueados/*locked nucleic acid*). Este tipo de antimiRs presentan una modificación en el anillo de ribosa, en el que se genera un puente extra que une el oxígeno 2' y el carbono 4' formando un anillo bicíclico. Esta estructura confiere mayor resistencia a nucleasas al mismo tiempo que aumenta la afinidad por con el miRNA diana.

Algunas de las características de los antimiRs, como son su pequeño tamaño o la conservación de sus dianas entre especies hacen de ellos una herramienta terapéutica de alto interés. Hasta la fecha, no hay publicadas posibles adversidades inmunogénicas o toxicológicas en humanos, sin embargo, el principal escollo para su uso como fármacos es la necesidad de aplicación de dosis repetidas para observar efectos terapéuticos a largo plazo²⁹³.

Por su parte, el potencial uso de miRNAs miméticos (mimic-miRs) o pre-miRs, resulta más problemático que el de los antimiRs, ya que suelen requerir el empleo de vectores víricos con las consecuentes dificultades y riesgos que implican, al igual que en la mayoría de terapias génicas¹⁸³. Por ello, en los últimos años, algunos estudios han ido encaminados a mejorar el tipo de administración de estos oligonucleótidos, empaquetándolos en nanopartículas lipídica²⁹⁴.

Varios estudios han investigado los efectos terapéuticos de la modulación de miRNAs en modelos murinos de AAA. Kim *et al*²⁶⁷ usaron una infusión continua de Ang II en ratones con deficiencia de apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) para inducir AAA (modelo ApoE^{-/-} //Ang II). Identificaron miR-712 específico murino y su homólogo humano miR-205 expresado diferencialmente en muestras de AAA. Los niveles elevados de estos miRNA se asociaron con niveles disminuidos de TIMP3 y de proteína rica en cisteína inductora de reversión con motivos *kazal* (RECK). También se observó una mayor actividad de MMP en AAA. Por el contrario, cuando se silenció miR-712 y miR-205 a ratones ApoE^{-/-} //Ang II, se observó una reducción significativa de la incidencia y mortalidad de AAA, posiblemente debido a la reducción de la MMP.

Por otro lado, la disregulación de miR-21 en tejido aórtico es de las más estudiadas. Su potencial terapéutico fue analizado por Maegdefessel *et al*²⁶⁵ en dos modelos murinos de AAA (proteína porcina elastasa (PPE) y modelos ApoE^{-/-} // Ang II). Observaron que la sobreexpresión de miR-21 en AAA se ve aumentada por la exposición a nicotina. También se observó que la administración de nicotina aceleró la expansión de AAA en ratones. Por el contrario, la infraexpresión de miR-21 utilizando un LNA antimir-21 condujo a un aumento en el tamaño de AAA y al riesgo de rotura, mientras que la sobreexpresión usando pre-miR-21 Lentiviral condujo a una estabilización a corto plazo del AAA en modelos murinos. De este modo concluyeron que la sobreexpresión de miR-21 es un factor estabilizador en los AAA²⁶⁵.

Además, Boon *et al*²⁷³ utilizó dos modelos murinos de AAA (Ang II y resistencia a la fibulina-4) y silenció miR-29 y sus secuencias maduras a través de LNA-29. Su hipótesis era que la regulación negativa de las proteínas de la MEC por miR-29 puede promover la formación de AAA. De este modo, silenciar miR-29 inhibiría el proceso degenerativo²⁹⁵. Por otro lado, Maegdefessel *et al*²⁶⁶ también observaron que el aumento de la expresión de miR-29b mediante el uso de un pre-miR-29b Lentiviral aumentó la expansión y la tasa de rotura de AAA.

Ambos estudios, tanto el de Maegdefessel como el de Boon, demostraron que la regulación negativa de miR-29 o miR-29b redujo la progresión de AAA.

Finalmente, Maegdefessel *et al*²²⁰ también demostraron en otro estudio que la modulación de la expresión de miR-24 puede afectar al desarrollo de AAA murino, la expansión y la ruptura en el modelo proteína porcina elastasa (PPE) a través de sus efectos en la *quitinasa-3-like protein 1* (CHI3L1). Utilizaron pre-miR-24 lentiviral, antimiR-24 y miR control para identificar el efecto de modulación. La sobreexpresión de miR-24 a través de la modulación con pre-miR-24 resultó en una marcada reducción en el crecimiento del AAA, mientras que la inhibición con antimiR-24 resultó en una expansión aumentada de AAA y una mayor tasa de rotura.

A pesar de lo prometedor de los resultados de la terapéutica basada en miRNA en estudios de AAA en modelos murinos, aun no se han investigado en estudios en AAA en humanos.

Parece improbable que la expresión de un miRNA sea específica para un solo proceso de enfermedad, por lo que la modulación de miRNA individuales puede tener impactos múltiples que aún no han se han identificado en estudios murinos²⁹⁶.

De hecho, todavía no se ha demostrado que un tratamiento específico de modulación de miRNA humano sea efectivo en un ensayo clínico, aunque los estudios para la modulación de miRNA en hepatitis C (VHC), enfermedad metabólica, enfermedades inflamatorias autoinmunes, tumores malignos y arterosclerosis son previsibles a corto plazo, siendo el Miravirsen el ejemplo más destacado²⁹⁷.

El Miravirsen (Roche, Basilea, Suiza / Santaris, Hørsholm, Dinamarca) y el RG-101 (antimiR inhibidor del microRNA-122; Regulus Therapeutics, Carlsbad, California, EEUU), diseñados para tratar VHC, se consideran los productos estrella de esta clase de medicamentos futuros.

Algunos productos, en particular para el diagnóstico del cáncer de tiroides (*Interpace Diagnostic*, Nueva Jersey, EEUU) ya están disponibles. Sin embargo, el mercado terapéutico, impulsado principalmente por imitadores de miRNA y productos antagomiR, está menos avanzado.

Todos los medicamentos basados en miRNA se encuentran actualmente en ensayos clínicos y ninguno ha alcanzado el avance farmacéutico. Sin embargo, la adquisición de compañías basadas en miRNA por las grandes farmacéuticas hace prever el despunte de múltiples iniciativas en los próximos años²⁹⁸, que serán determinantes para el potencial desarrollo de estas terapias.

De este modo, se ha informado de un número cada vez mayor de patentes en fase de solicitud o ya aprobadas, en relación a la terapéutica basada en miRNA²⁹⁷.

3 HIPÓTESIS

Los miRNAs juegan un papel importante en el desarrollo de diversas patologías vasculares como el AAA. Los niveles de los miRNAs podrían verse alterados en presencia de AAA y se podrían disregular tanto a nivel tisular como plasmático en pacientes con AAA. Los miRNAs alterados localmente podrían estar regulando dianas moleculares implicadas en los mecanismos de formación del AAA.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo primario:

- Identificar nuevas moléculas involucradas en el desarrollo de AAA en humanos.

4.2 Objetivos secundarios:

- Identificar miRNAs circulantes disregulados en pacientes con AAA para explorarlos como potenciales biomarcadores plasmáticos.
- Evaluar la alteración de los miRNAs alterados en tejido aneurismático de muestras quirúrgicas.
- Realizar un estudio integral de las posibles dianas reguladas por los miRNAs alteradas en tejido para identificar nuevos marcadores relacionados con AAA.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño y ámbito

Se trata de un estudio prospectivo de casos y controles en el que analizamos los miRNAs disregulados en el desarrollo de aneurismas de aorta abdominal (AAA) en humanos. La muestra poblacional se obtuvo de los pacientes seguidos y tratados de AAA en un servicio de Angiología y Cirugía Vascul ar de un Hospital Universitario terciario.

La recogida de datos se realizó entre 2015 y 2018. El estudio consta de las siguientes etapas:

En una **primera etapa**, se realizó un **cribado**, dónde analizamos los niveles de expresión de un gran número de miRNAs (179) en una selección representativa de muestras de plasma, a partir de la cual seleccionamos los miRNAs candidatos que podrían estar disregulados en pacientes con AAA.

En la **segunda fase**, **cuantificamos** los miRNAs seleccionados en el total de las muestras de **plasma** para evaluar su posible utilidad como biomarcadores. Los miRNAs seleccionados se cuantificaron también en **muestras de tejido** para evaluar su posible disregulación local.

Finamente, se realizó un estudio *in silico* de las posibles **dianas** reguladas por los miRNAs alterados en **tejido** y se validó la alteración de las proteínas codificadas por los genes seleccionados a nivel tisular.

El tamaño muestral se ha obtenido en base a los estudios de la misma naturaleza previamente publicados²⁹⁹ y está limitado por el número de cirugías programadas de este hospital para la extracción de muestras de plasma y tejido.

En la Figura 5 y 6 podemos observar un resumen de las fases del desarrollo de nuestro estudio.

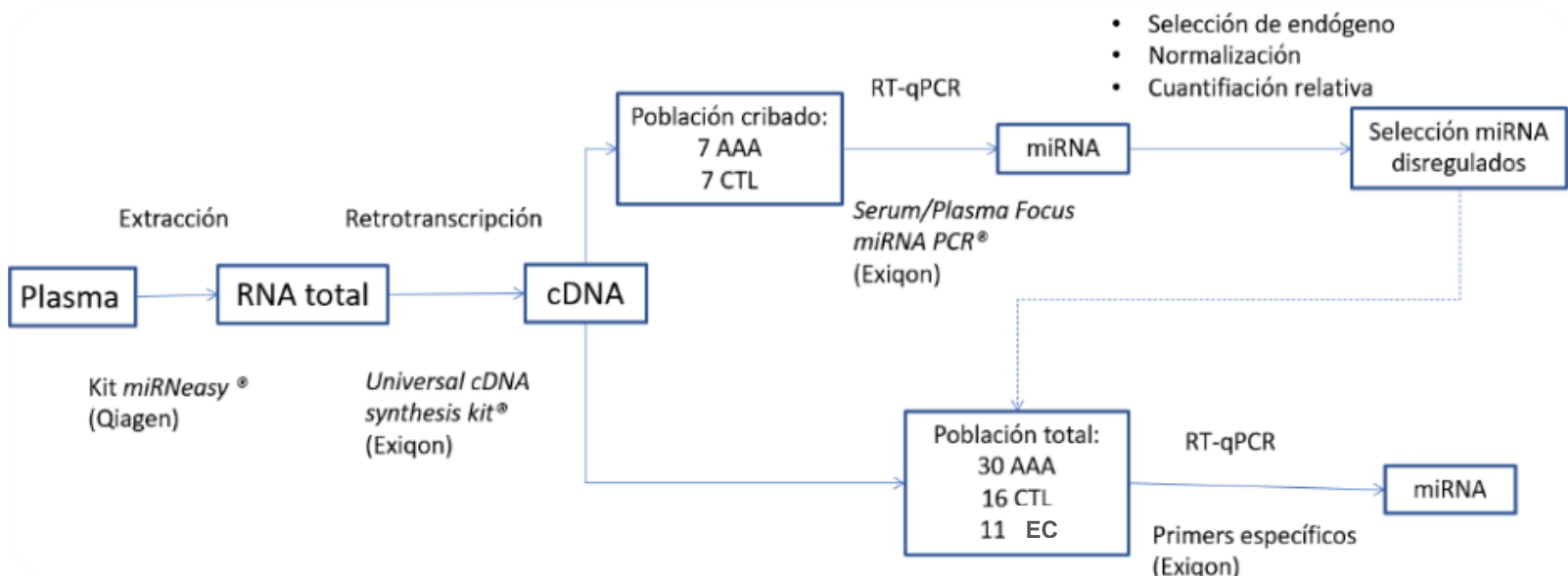


Figura 5. Esquema del estudio en plasma. Inicialmente, realizamos una etapa de cribado con un número reducido de pacientes mediante paneles en los que medimos 179 miRs, normalizamos frente a un endógeno estable y seleccionamos los miRNAs disregulados. Los miRs seleccionados se cuantificaron en la totalidad de la muestra mediante PCR cuantitativa en tiempo real. AAA: aneurisma de aorta abdominal; CTL: control; EC: endarterectomía carotídea; miRNA: microRNA; cDNA: del inglés, *complementary deoxyribonucleic acid*; RNA: *ribonucleic acid*; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción inversa cuantitativa.

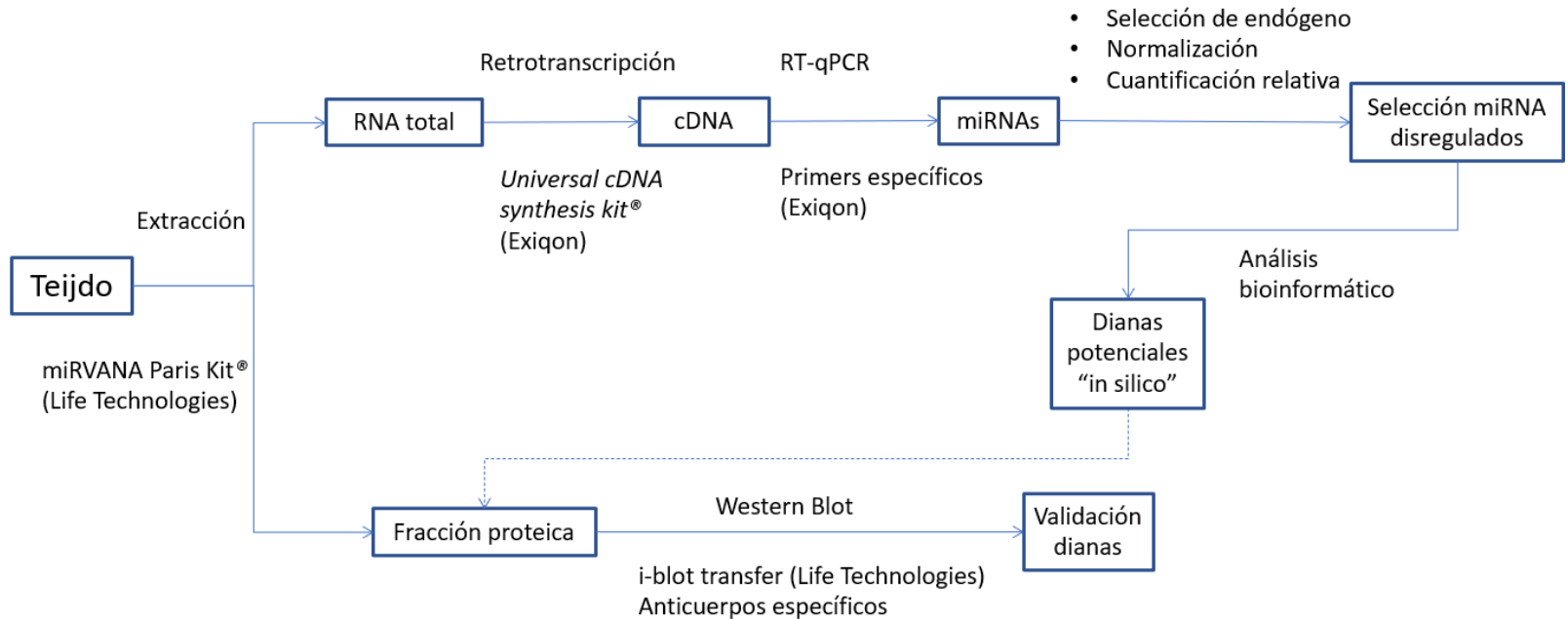


Figura 6. Esquema del estudio en tejido. Los miRNAs seleccionados se cuantificaron en las muestras de tejido. Con los miRNAs disregulados, se realizó un análisis bioinformático para identificar las posibles dianas *in silico*, se escogieron las más relevantes y se validaron en la misma fracción de muestra. miRNA: microRNA; cDNA: del inglés, *complementary deoxyribonucleic acid*; RNA: *ribonucleic acid*; RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real de transcripción inversa cuantitativa.

5.2 Población (selección de pacientes):

Criterios de inclusión de **pacientes** con AAA:

- Pacientes mayores de edad con AAA sometidos a intervención quirúrgica. El diámetro aórtico máximo del AAA se determinó a partir del angioTC preoperatorio solicitado para planificar la cirugía. Los pacientes operados presentaban un tamaño mayor de 5 cm. Las mediciones y la planificación de los casos se realizaron mediante reconstrucciones multiplanares en la estación de trabajo de Siemens (Syngo.via).
 - Plasma: cirugía abierta y REVA.
 - Tejido: cirugía abierta.

Criterios de **inclusión de controles y pacientes con estenosis carotídea (EC/CE, *carotid endarterectomy*)**:

- Hombres mayores de 55 años.
- Ausencia de AAA. Se descartó la presencia de aneurisma mediante pruebas de imagen complementarias previas realizadas por otro motivo, ya fuera TC o resonancia magnética (RM), o mediante eco-doppler abdominal en los individuos que no disponían de dichas pruebas que descartasen esta patología.

Criterios de exclusión:

- Pacientes intervenidos de manera urgente por rotura aórtica.
- Presencia de enfermedades graves sistémicas (como cáncer, virus inmunodeficiencia humana (VIH) o VHC), enfermedades inflamatorias o degenerativas, infección activa.
- Aneurismas sintomáticos o incluidos dentro de alguna conectivopatía como la enfermedad de Marfan, Ehlers-Danlos, etc.

Los factores de riesgo cardiovascular diabetes mellitus (DM), dislipemia (DL) e hipertensión (HTA) fueron diagnosticados previamente por los médicos de atención primaria según las guías correspondientes (Sociedad Europea de Cardiología³⁰⁰, Sociedad Europea de Hipertensión³⁰¹, Asociación Americana de Diabetes³⁰²). Se detectaron mediante revisión de los registros médicos, en el momento del muestreo, y se consideraron positivos aun cuando estuvieron controlados con medicación. El tabaquismo se consideró presente si los sujetos eran fumadores o exfumadores desde hacía menos de 5 años.

5.2.1 Estudio en plasma:

Para el estudio de plasma se reclutaron 57 individuos varones:

- **30 pacientes** intervenidos por AAA mediante cirugía abierta (N=10) o REVA (N=20) (grupo pacientes, p-AAA).
- **16 voluntarios sanos** (grupo control, p-CTL).
- **11 pacientes con arterioesclerosis severa**, con estenosis de carótida significativa sometidos a endarterectomía (grupo p-EC/CE, *carotid endarterectomy*).

5.2.2 Estudio en tejido:

Se obtuvieron 29 muestras de tejido procedente de pared de aorta abdominal:

- **21** muestras de pacientes con **AAA** intervenidos mediante cirugía abierta (t-AAA).
- **8** muestras de **donantes** de órganos sin evidencia de aneurisma (t-CTL).

El presente estudio se realizó de acuerdo con la declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético de Investigación Biomédica del Hospital la Fe (referencia 2013/0068, aprobada el 9 de abril de 2013 y revisada el 7 julio de 2015).

Todos los participantes aceptaron colaborar en el estudio mediante la firma del correspondiente consentimiento informado. En los casos oportunos, los pacientes firmaron, además, el consentimiento de donación voluntaria de muestras establecido por el Biobanco de la Fe.

5.3 Procesado de muestras

5.3.1 Procesado de muestras en plasma

De cada paciente incluido se extrajo una muestra de sangre venosa periférica de 3 ml, recogida en un tubo con 5,4 mg de K₂EDTA (sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Las muestras se procesaron durante las dos primeras horas desde la extracción. Tras su centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 1811 g, el plasma obtenido se distribuyó en alícuotas de 250 µl que se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

5.3.2 Procesado de muestras en tejido

De cada paciente intervenido de AAA mediante cirugía abierta, se recogió una muestra de pared aórtica aneurismática que se extrajo previo al cierre del saco tras la reparación mediante injerto aorto-aórtico, iliaco o femoral correspondiente.

De cada individuo control (pacientes donantes de órganos), se extrajo una muestra circunferencial suficiente de aorta infrarrenal (al menos 2x2 cm).

En ambos casos, las muestras tejido se lavaron con suero fisiológico y se congelaron inmediatamente mediante inclusión en nitrógeno líquido.

Se almacenaron y gestionaron hasta por el Biobanco La Fe (PT17/0015/0043) con la aprobación de sendos Comités de Ética y Científico y fueron procesadas siguiendo procedimientos normalizados.

5.4 Aislamiento de miRNA

5.4.1 Aislamiento de miRNA en plasma

De cada alícuota de 250 µl de plasma se extrajo el RNA total mediante el kit específico *miRNeasy mini-kit* (Qiagen, Hilden, Alemania), que permite la extracción de RNA de pequeño tamaño, aplicando un protocolo optimizado. Una de las modificaciones del protocolo implica la adición de un RNA *carrier* durante el aislamiento cuya finalidad es aumentar el rendimiento de la extracción.

En esta etapa se añade una combinación de RNAs sintéticos (*spike in* -2, -4 -5) que servirán como control interno de eficiencia de extracción. El rendimiento y la pureza del RNA obtenido se estimó mediante espectrofotometría (cociente A280/A260) en un espectrofotómetro nanodrop Nd-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU). El RNA obtenido se almacenó a -80° C hasta su uso.

5.4.2 Aislamiento de miRNA en tejido

El RNA total y la fracción proteica se aislaron simultáneamente de las muestras de tejido aórtico con el kit miRVANA PARIS® kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se homogeneizó un corte transversal de la muestra de tejido con el TissueLyser LT® (Qiagen, Hilden, Alemania) (condiciones de homogeneización: 50MHz, 5 minutos) en 625 µl de tampón de disrupción celular con 7 µl de un cóctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem, Merk, Darmstadt, Alemania). Se utilizaron 400 µl del lisado del tejido para el aislamiento de RNA y el volumen restante para el aislamiento de proteínas.

El aislamiento del RNA se realizó añadiendo 400 µl de solución desnaturante, proporcionada en el kit, seguido de una separación de fases con 800 µl de fenol-cloroformo. Después de los pasos de lavado indicados en el protocolo, se diluyó el RNA con 100 µl de agua destilada estéril libre de DNasa/RNasa precalentada a 95°C. La fracción de proteína se sonicó (3 pulsos de 5 segundos), se distribuyó en alícuotas de 50 µl, se congeló instantáneamente en N2 líquido y se almacenó a -80° C hasta su uso.

El RNA extraído se sometió a un tratamiento con DNasa, (Turbo DNasa, Ambion), consistente en una incubación de 30 minutos a 37°C con la DNasa, seguida de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, con el reactivo de inactivación proporcionado en el kit. El RNA tratado con DNasa se almacenó a -80° C hasta su uso.

El rendimiento y la pureza del RNA obtenido se estimó mediante espectrofotometría (cociente A280/A260) en un espectrofotómetro nanodrop Nd-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

5.5 Síntesis de cDNA

A partir del RNA extraído tanto de plasma como de tejido, se obtuvo la primera cadena de DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción.

En el caso de las muestras de plasma, debido a la adición del RNA *carrier* en la etapa de extracción, el rendimiento final del RNA incluye el RNA aislado del plasma junto con el RNA *carrier*. Como consecuencia y, de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores, la cantidad inicial de RNA utilizada en la reacción de retrotranscripción se basa en el volumen (μl) en lugar de la cantidad de RNA (ng) dado que la cuantificación en ng está enmascarada por el *carrier*.

Así pues, en el estudio en plasma, se obtuvo cDNA con el kit de síntesis de cDNA Universal® (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca), de acuerdo con el protocolo suministrado, a partir de 5 μl y 2 μl de RNA plasmático para un volumen final de reacción de 25 μl en la etapa de cribado y 10 μl en la etapa de validación, respectivamente.

Para el estudio en tejido, se obtuvo cDNA a partir de 10 ng de RNA total (volumen de reacción final de 10 μl). Se llevaron a cabo dos reacciones independientes para cada muestra como réplicas.

En la mezcla de reacción (tanto para plasma como para tejido) se añade, además, un RNA-sintético *spike in 6* que nos servirá como control de eficiencia de la reacción.

Las condiciones de reacción de retrotranscripción para la obtención de la primera cadena de cDNA tanto en el caso de plasma como de tejido consisten en un ciclo de 60 minutos a 42°C, seguido de 5 minutos a 95°C. El cDNA obtenido conservó a -20°C hasta un máximo de 5 semanas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TC412 (Techne, Keison Products, Chelmsford, Reino Unido).

5.6 Cuantificación de miRNA

5.6.1 Cribado en plasma

La metodología empleada para la cuantificación de un gran número de miRNAs en muestras biológicas supone un coste económico elevado. Por tanto, es habitual realizar una primera etapa de cribado en una pequeña muestra de la población de estudio y posteriormente seleccionar un número limitado de miRNAs para cuantificar en el total de las muestras, disminuyendo así el coste experimental.

Por ello, en este caso, la etapa de cribado se realizó en 14 muestras de plasma, 7 muestras de p-AAA y 7 muestras de p-CTL. Se cuantificaron los miRNAs más abundantes en plasma mediante el empleo de paneles prediseñados con el Serum/plasma *Focus microRNA PCR Panel V4* de 384 pocillos (Exiqon-Qiagen, Hilden, Alemania) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y con *ExiLENT SYBR Green® master mix* (Exiqon-Qiagen, Hilden, Alemania) como fluoróforo, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los paneles contienen 179 sondas para detección de miRNAs estables y abundantes en plasma/suero, candidatos a emplearse como miRNAs de referencia, y 5 controles internos (*spike in*) que permiten comprobar la calidad de las distintas etapas.

Las reacciones de RT-qPCR y las lecturas de fluorescencia se realizaron en un termociclador Lightcycler 480 (Roche, Basilea, Suiza / Santaris, Hørsholm, Dinamarca) en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización de la polimerasa → 10 minutos a 95°C (x1 ciclo).
- Amplificación → 10 segundos a 95°C + 1 minuto a 60°C (x45 ciclos).

Los resultados de expresión (CTs) se normalizaron frente a un miRNA endógeno y estable (miR-191-5p) que se utilizó para calcular el $2^{-\Delta\Delta CT}$ de cada miRNA individual.

5.6.2 Confirmación de miRNAs disregulados en plasma

A partir de la etapa de cribado (*screening*), se seleccionaron 10 miRNAs para confirmar su disregulación en la muestra completa:

miR-27b-3p [MIMAT0000419]	miR-144-3p [MIMAT0000436]
miR-152-3p [MIMAT0000438]	miR-146a-5p [MIMAT0000449]
miR-7-1-3p [MIMAT0004553]	miR-1260a [MIMAT0005911]
miR-375 [MIMAT0000728]	miR-221-3p [MIMAT0000278]
miR-103a-3p [MIMAT0000101]	miR-99a-5p [MIMAT0000097]

Además, se incluyó el miR-195-5p [MIMAT0000461] debido a su relevancia en el AAA descrita en la literatura^{268,303-304}. miR-191-5p [MIMAT0000440] se utilizó como normalizador.

Los miRNA seleccionados se cuantificaron mediante RT-qPCR en el total de las muestras (N=57, p-AAA y p-CTL) utilizando cebadores específicos, *LNA@primers set* (Exiqon, Qiagen, Hilden, Alemania) y el fluoróforo SybrGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Se aplicaron las mismas condiciones de RT-qPCR que en la etapa de cribado (ver esquema general, Figura 5)

5.6.3 Cuantificación de miRNAs en muestras de tejido

Los 11 miRNAs cuantificados en plasma, junto con 6 miRNA adicionales

miR-1 [MIMAT0000416]	miR-21-5p [MIMAT0000076]
miR-133a [MIMAT0000427]	miR-29b-3p [MIMAT0000100]
miR-133b [MIMAT0000770]	miR-155-5p [MIMAT0000646]

seleccionados según su relevancia en la bibliografía^{203,265,282,305}, se cuantificaron en las muestras de tejido (t-AAA y t-CTL, donantes de órganos), utilizando la misma tecnología. Los valores de expresión de estos miRNAs en tejido se normalizaron frente al miR423-5p [MIMAT0004748], que resultó el más estable en este tipo de muestras. La cuantificación de los miRNAs se realiza de manera relativa y previa normalización, dado que no hay estándares predefinidos de los niveles de miRNAs en sangre, como puede ocurrir con otro tipo de moléculas como son las proteínas.

Se aplicaron las mismas condiciones de RT-qPCR que en el estudio en plasma y las lecturas de fluorescencia se llevaron a cabo en un termociclador *Lightcycler 480* (Roche, Basilea, Suiza / Santaris, Hørsholm, Dinamarca).

5.6.3.1 Estudio *in silico* de dianas potenciales

Las dianas potenciales de los miRNAs disregulados en muestras de tejidos se analizaron mediante un análisis de enriquecimiento de genes (GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*), un método computacional que permite evaluar si un subconjunto de genes muestra una representación significativa relacionada con una característica definida, es decir, que permite estudiar de manera conjunta las posibles dianas de los miRNAs disregulados, teniendo en cuenta las rutas o procesos comunes en las que puedan estar participando.

Para ello, realizamos un análisis bioinformático siguiendo las condiciones descritas previamente³⁰⁶, junto con la colaboración de expertos en bioinformática del servicio de genómica del instituto de Investigación Sanitaria del Hospital la Fe. Los genes diana se obtuvieron mediante un análisis computacional que racaba la información recopilada en las siguientes bases de datos: TargetScan (versión 7.1)³⁰⁷, miRDB (versión 5.0)³⁰⁸ e información validada de miRTarBase (versión 7.0)³⁰⁹.

Esta búsqueda arroja dos tipos de resultados: **dianas validadas**, cuando existen estudios previos que ya han validado experimentalmente esta regulación; y **dianas predichas**, que se estiman teóricamente en función de la complementarias de la secuencia de unión miRNA-mRNA.

Con esta aproximación bioinformática, se identificaron también, los principales Procesos biológicos (BP), Funciones moleculares (MF) y Componentes celulares (CC) afectados por los miRNAs disregulados, según la clasificación del proyecto *Gene Ontology* (GO)³¹⁰. Según las definiciones de GO, los términos MF describen actividades que ocurren a nivel molecular (*molecular functions*); CC se refiere a las ubicaciones de las estructuras celulares en las que una molécula realiza una función, ya sea en compartimentos celulares o en complejos macromoleculares estables de los que forman parte; y BP define procesos más amplios compuestos por múltiples actividades moleculares.

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los transcritos identificados como posibles dianas de los miRNAs disregulados, para identificar aquellos relacionados con procesos o patologías vasculares (ver esquema general, Figura 6.

5.7 Cuantificación de proteínas mediante *western blot*

A partir del estudio *in silico*, según la clasificación de GO y la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG)³¹¹ se seleccionaron 5 dianas potenciales según su relevancia y su relación con AAA y otros trastornos vasculares, y se cuantificó la expresión proteica en tejido mediante *Western Blot*, consistente en una separación proteica por SDS-page, seguida de una transferencia a membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) y de una inmunodetección con anticuerpos específicos.

Para cuantificar la concentración total de proteína a analizar por *Western blot*, se empleó el método BCA (*ácido bicinconónico*) utilizando el kit Pierce™ *BCA protein assay kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) según las indicaciones del fabricante.

5.7.1 SDS-Page

Se desnaturalizaron 20 µg de proteína a 99°C durante 10 minutos con *Novex Bolt™ LDS sample buffer* y *Novex Bolt™ simple reducing Agent* (Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU) en un volumen final de 25 µl.

Se cargaron los 25 µl de muestra y 10 µl de marcador de peso molecular (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*) en un gel de acrilamida en gradiente Bis-Tris 4-12% (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*; Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU).

Se aplicó un voltaje inicial de 80V, hasta que las proteínas alcanzan el gel, seguido de 120 V durante 1h.

5.7.2 Trasferencia de proteínas

La transferencia de proteínas se realizó empleando el kit *iBlot Gel Transfer Stacks* de PVDF (Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU). Para ello, se colocó el gel entre el ánodo y el cátodo. Se introdujo el kit en el transferidor *iBlot™ 2 Gel Transfer Device* (Life Technologies, Carlsbad, California, EEUU) y se aplicó un voltaje de 10V durante 25 minutos.

Se tiñó el gel con Azul Coomassie (ver Anexo 12.1), para visualizar las proteínas no transferidas (10 minutos en agitación seguidos de 20 minutos con solución de destinción) y se tiñó la membrana con rojo Ponceau (5 minutos con agitación seguida de 2 minutos con el tampón *tris-buffered saline*, TBST), para comprobar la transferencia. La membrana se lavó 30 minutos adicionales con TBST.

5.7.3 Inmunodetección de proteínas

La fase de inmunodetección constó de las siguientes etapas:

1. Bloqueo, 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (5% leche desnatada en polvo en TBST) en agitación.
2. Lavado de la membrana 2 veces con TBST, en agitación, para eliminar el exceso de agente bloqueante.

3. Incubación con el anticuerpo primario (incubación nocturna a 4°C, con agitación) a la concentración óptima en tampón de bloqueo y azida sódica al 0,05%. Los anticuerpos utilizados fueron:
 - Anticuerpos policlonales de conejo (Proteintech, Rosemont, IL, EEUU):
 - Integrina $\alpha 5$ ITGAV (ref: 27096-1-AP) en dilución 1:1000,
 - subunidad de laminina 3β LAMB3 (ref: 2678-1-AP) en dilución 1:1000,
 - proteína de dominio LIM y SH3 1, LASP1 (ref:10515-1-AP) en dilución 1:4000.
 - Anticuerpos policlonales de conejo (GeneTex, ciudad de Hsinchu, Taiwan):
 - colágeno XI $\alpha 1$, COL11A1 (ref: GTX55142), en dilución 1:500.
 - y THBS2 Rabbit (THBS2) (ref: GTX64459), en dilución 1:1000.
 - Anticuerpos monoclonales de ratón α -tubulina (DM1A); (Cell Signalling, Leiden, Netherlands) como referencia
4. Lavado con TBST (2 lavados durante 10 minutos a RT en agitación).

5. Incubación con anticuerpo secundario (dilución 1:3000 en la solución de bloqueo (1 hora, TA, agitación). Los anticuerpos secundarios empleados fueron:
 - IgG de oveja anti-ratón marcado con ECL™, fragmento F (ab')₂ ligado a HRP de oveja; (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido).
 - Conjugado IgG (H + L) -HRP anti-conejo de cabra (Bio Rad, Hercules, California, EEUU).
6. Lavado con TBST (3 lavados, durante 10 min a RT en agitación).
7. Revelado 1 minuto con sistema *Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EEUU).

5.8 Análisis estadístico de los datos

Los resultados de la expresión de los miRNAs obtenidas en las RT-qPCR (CT, *cicle threshold*) se expresaron como media \pm desviación estándar de las réplicas. Los valores medios de CTs de cada miRNA se normalizaron frente a los valores de CTs del miRNA endógeno más estable seleccionado mediante el *software* RefFinder³¹² según su estabilidad para cada estudio independientemente (plasma o tejido). Este *software* comprende los resultados de 4 algoritmos comúnmente empleados: Delta CT, BestKeeper, Normfinder y Genorm. Los valores relativos de expresión (pacientes frente a controles) se calcularon como $2^{-\Delta\Delta CT}$.

En la etapa de cribado en plasma, los miRNAs candidatos se identificaron utilizando un algoritmo de clasificación de *Random Forest*³¹³ y se seleccionaron en relación con su nivel de expresión, sus veces de cambio (pacientes frente a controles) y su relevancia en procesos cardiovasculares.

Las variables continuas se expresaron como media \pm desviación estándar y se compararon entre los distintos grupos mediante test T de Student. Las variables categóricas se expresaron como frecuencias absolutas y relativas y se compararon con la prueba de Fisher.

Los resultados de expresión de miRNAs en plasma se ajustaron a un modelo de regresión lineal multivariable según los factores de riesgo cardiovascular: edad, HTA, DL, DM y tabaquismo. Los resultados de expresión de miRNAs en tejido se ajustaron a un modelo de regresión lineal. Los análisis de correlación entre variables continuas se realizaron mediante el test de correlación de Pearson.

Los análisis se realizaron con el *software Graphpad prism v8* (San Diego, California, EEUU) y con el *software* estadístico R (versión 3.5.0, Vienna, Austria) considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Se utilizó el *software Cytoscape™* versión 3.6.0, un *software* gratuito para modelos integrados de redes de interacción biomolecular, para generar una red que muestra las conexiones miRNA-mRNA³¹⁴.

6 RESULTADOS

6.1 Cuantificación de miRNA en plasma

6.1.1 Etapa de cribado

Las características de los individuos incluidos en la etapa de cribado en plasma (N=14, 7 p-AAA y 7 p-CTL) se muestran en la Tabla 6.

Los factores de riesgo de los pacientes ya estaban diagnosticados y tratados inicialmente por su médico de atención primaria, según las guías nacionales e internacionales de referencia correspondientes a cada patología descrita (<http://www.who.int/publications/list/PocketGLspanish.pdf?ua=1>, www.semfyc.es).

Todos los sujetos eran hombres, por lo que el sexo no se tuvo en cuenta como variable. No se observaron diferencias significativas entre HTA, DL, DM y tabaquismo entre ambos grupos. El grupo de controles resultó significativamente más joven que el de pacientes con AAA.

Tabla 6. Características clínicas de los sujetos de estudio incluidos en la etapa de cribado. Las diferencias de las variables entre los grupos se analizaron mediante t-test y tablas de contingencias χ^2 . AAA: Aneurisma de aorta abdominal. p-CTL: plasma de controles; p-AAA: plasma de aneurisma de aorta abdominal.

VARIABLE	p-CTL (n=7)	(%)	p-AAA (n=7)	(%)	<i>p</i>
Edad	62±3		72±7		<0,05
Hipertensión	5	71	7	100	0,213
Diabetes	2	29	2	29	1
Dislipemia	5	71	6	86	0,515
Tabaquismo	4	57	2	29	0,280

En la **etapa de cribado** se cuantificaron 179 miRNAs presentes en plasma mediante paneles prediseñados. Los candidatos a miRNAs de referencia por su elevada estabilidad en plasma, según las recomendaciones indicadas en dichos paneles fueron: miR-423-5p, miR-425-5p, miR-93-5p, miR-103a-3p y miR-191-5p. Tras el análisis por los algoritmos comprendidos en la herramienta de análisis RefFinder³¹⁵⁻³¹⁶, se seleccionó miR-191-5p como el miRNA endógeno más estable y, por tanto, de referencia para nuestro estudio en plasma.

De los miRNAs cuantificados, descartamos 39 miRNAs con una CT mayor que 36, ya que se consideraron fuera del umbral de detección. Para los miRNAs restantes, se calculó $2^{-\Delta CT}$ con respecto a miR-191-5p y se compararon sus niveles de expresión entre pacientes y controles. Aplicando el algoritmo de clasificación de *Random Forest* a los valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de 139 miRNAs y los factores de riesgo, se obtuvo una lista con las variables ordenadas por su relevancia en la diferenciación de ambos grupos, las primeras 30 se muestran en la Figura 7.

En esta clasificación, según el coeficiente de Gini (número entre 0 y 1, en donde 0 se corresponde con la perfecta igualdad y el valor 1 se corresponde con la perfecta desigualdad) la edad resulta la variable más destacada confirmando que los otros factores de riesgo estudiados (HTA, diabetes, dislipemia y tabaquismo) no afectan significativamente a los resultados.

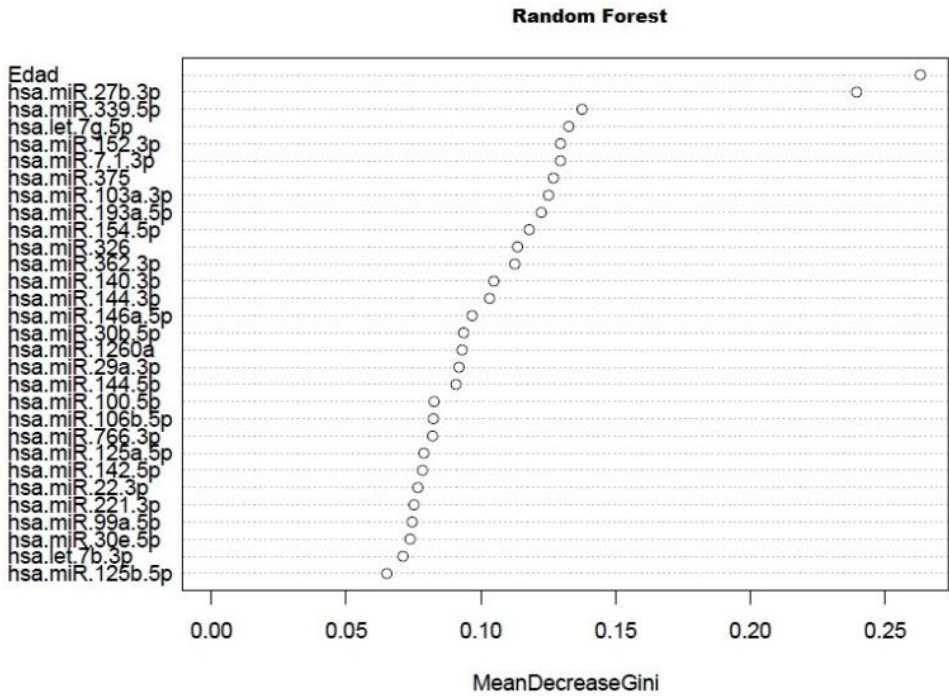


Figura 7. Resultados del Random Forest. Se realizó con 144 variables incluyendo 139 miRNA, la edad, HTA, DM, DL y el hábito tabáquico. Variables ordenadas por relevancia decreciente según el índice de Gini.

En la Tabla 7 se muestran los valores de las veces de cambio de los miRNAs incluidos entre las 30 variables más relevantes proporcionadas por el análisis mediante *Random Forest*. Los valores oscilan entre -2,27 (infraexpresión en pacientes) y 3,24 veces (sobrexpresión en pacientes).

Tabla 7. Veces de cambio de los miRNAs destacados en la clasificación por *Random Forest*. Las veces de cambio se define como la relación entre el nivel de expresión promedio de un miRNA en pacientes y controles. Los niveles de expresión se calculan por el método ΔCT , corresponden a $2^{-\Delta\Delta CT}$ cociente de las medias de $2^{\Delta CT}$ (pacientes) frente a $2^{\Delta CT}$ (controles). Los valores negativos se calculan como $- (1/\text{veces de cambio})$.

Nombre	Veces de cambio	Nombre	Veces de cambio	Nombre	Veces de cambio
miR-27b-3p	1,39	miR-362-3p	-1,37	miR-766-3p	1,73
miR-339-3p	1,92	miR-140-3p	1,45	miR-125a-5p	1,42
let-7g-5p	1,10	miR-144-3p	-2,13	miR-142-5p	1,23
miR-152-3p	2,52	miR-146a-5p	1,66	miR-22-3p	1,96
miR-7-1-3p	-2,27	miR-130b-3p	1,51	miR-221-3p	1,50
miR-375	2,45	miR-1260a	2,06	miR-99a-5p	2,71
miR-103a-3p	-1,39	miR-29a-3p	1,34	miR-30e-3p	1,81
miR-193a-5p	3,44	miR-144-5p	1,23	let-7b-3p	3,24
miR-154-5p	1,01	miR-100-5p	1,65	miR-125b-5p	1,34
miR-326	2,59	miR-106b-5p	-1,27		

Para identificar los miRNAs candidatos para su estudio como posibles marcadores, se tuvo en cuenta los resultados del *Random Forest*, los niveles de expresión y las veces de cambio, así como una revisión bibliográfica exhaustiva en las que se identificaron aquellos relacionados con procesos vasculares, como la inflamación o el metabolismo lipídico³¹⁷⁻³²².

De este modo se seleccionaron 10 miRNAs (miR-27b-3p, miR-152-3p, miR-7-1-3p, miR-375, miR-103a-3, miR-144-3p, miR-146a-5p, miR-1260a, miR-221-3p y miR-99a-5p) que se cuantificaron en el total de las muestras (N=57). Además, aunque no aparecía entre las variables destacadas, seleccionamos, el miR-195-5p³²³ para su cuantificación en la siguiente etapa, debido a su posible implicación en la patología estudiada^{268,305-306}.

6.1.2 Validación en plasma

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los factores de riesgo de todos los sujetos incluidos en el estudio de plasma (N=57).

Tabla 8. Características clínicas del total de sujetos incluidos en el estudio de plasma. Las diferencias de las variables entre los grupos se analizaron mediante t-test y tablas de contingencias χ^2 . p-CTL: plasma de controles; p-AAA: plasma de aneurisma de aorta abdominal; p-EC/CE: plasma de estenosis carotídea; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DL: dislipemia; AAS: ácido acetil salicílico.

VARIABLE	p-CTL	p-AAA	p-valor (p-AAA vs p-CTL)	p-EC/CE	p-valor (p-EC vs p-CTL)	p-valor (p-EC vs p-AAA)
	N=16	N=30		N=11		
Edad	62,7 ±4,71	74,1 ±7,67	<0,001	67,91 ±5,94	0,038	0,019
HTA	10 (62,5%)	27 (90%)	0,035	7 (63,6%)	0,952	0,047
DM	2 (12,5%)	13 (43,3%)	0,046	6 (54,5%)	0,028	0,523
DL	14 (87,5%)	20 (66,7%)	0,14	7 (63,6%)	0,158	0,856
Tabaquismo	4 (25%)	14 (46,7%)	0,158	8 (72,7%)	0,019	0,132
Cirugía abierta		10 (33,3%)				
Diámetro AAA (mm)		57,3				
Estatinas	4 (25%)	21 (70%)		10 (90,9%)		
Antihipertensivos no betabloqueantes	10 (62,5%)	23 (76,7%)		7 (63,6%)		
Antihipertensivos betabloqueantes	2 (12,5%)	8 (26,7%)		4 (36,4%)		
AAS	2 (12,5%)	11 (36,7%)		7 (63,6%)		
Otros antiplaquetarios	1 (6,3%)	5 (16,7%)		3 (27,3)		
Anticoagulación	0%	4 (13,3%)		1 (9,1%)		

Todos los individuos incluidos en el estudio eran hombres y un único sujeto (en el grupo control) informó de historia familiar de AAA. Los aneurismas intervenidos (diámetro mayor de 5,5 cm) se repararon mediante cirugía abierta (N=10) o REVA (N=20) según las características, factores de riesgo de los pacientes y la anatomía de los AAA³²⁴.

La mayor diferencia entre el grupo control y el grupo AAA se observó en la edad: $62,7 \pm 4,71$ y $74,1 \pm 7,67$, respectivamente ($p < 0,001$). También se observaron diferencias en hipertensión ($p = 0,034$) y diabetes ($p = 0,046$), siendo ambas más prevalentes en el grupo p-AAA.

Si comparamos el grupo p-EC/CE con el grupo p-CTL observamos mayor edad, mayor presencia de diabetes y mayor número de fumadores en el grupo p-EC/CE ($p = 0,038$), ($p = 0,028$) y ($p = 0,019$), respectivamente.

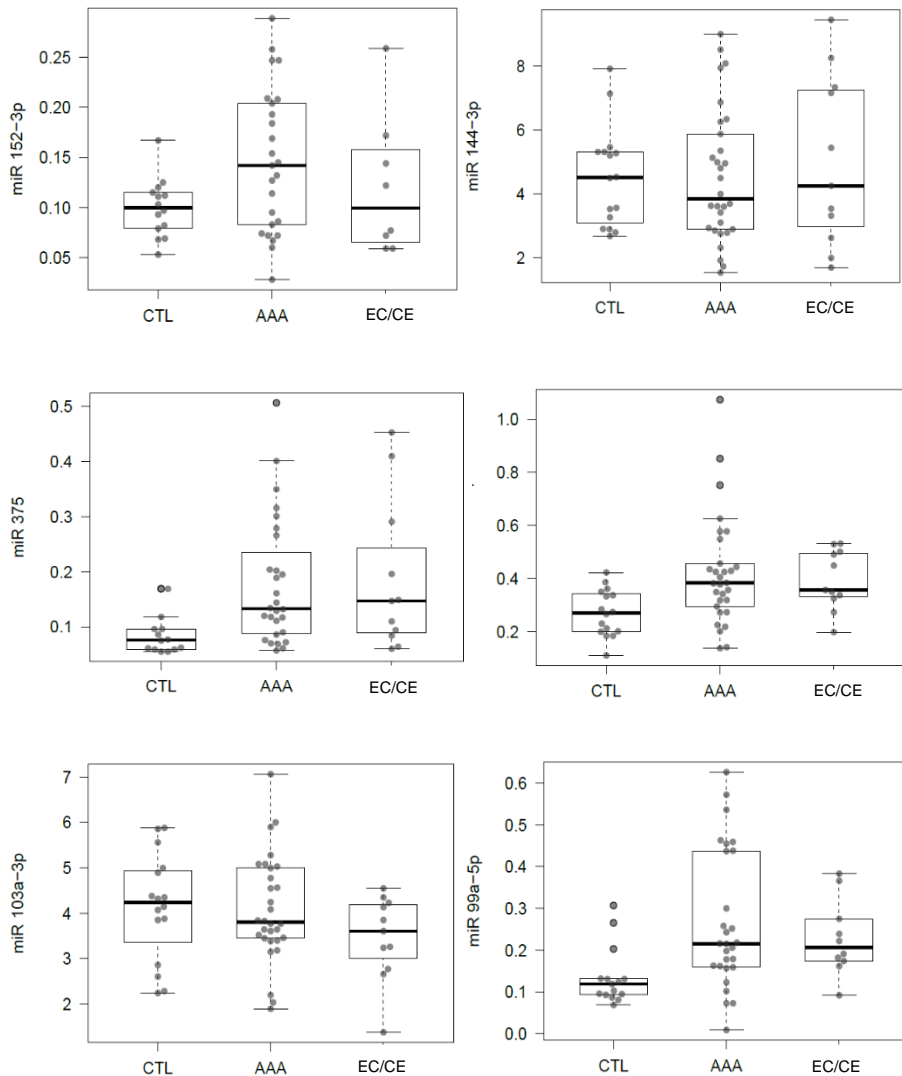
Finalmente, comparando los dos grupos patológicos (p-AAA y p-EC/EC) únicamente observamos diferencias en la edad, aunque menores que al comparar con el grupo control ($74,1$ vs $67,91$; $p = 0,019$) y en la HTA, más prevalente en los pacientes con AAA ($p = 0,047$). En cuanto a la medicación, se detectaron diferencias significativas en el uso de estatinas entre p-AAA y p-EC/CE frente a controles, $p = 0,004$ y $< 0,001$ respectivamente. Además, el uso de ácido acetil salicílico (AAS) fue más frecuente en p-EC/CE que en p-CTL ($p = 0,006$).

A continuación, cuantificamos los 11 miRNAs seleccionados, en el total de las muestras (N=57). Se descartaron en esta etapa 2 de los miRNAs (miR-7-1-3p y miR-195-5-p) por presentar valores de CTs fuera del rango de detección en la mayoría de las muestras. Los valores de expresión en plasma los observamos en la Tabla 9.

Tabla 9. Valores de expresión de los 9 miRNAs cuantificados en el total de las muestras de plasma (p-AAA y p-CTL). Los valores se normalizaron frente a miR-191-5p. Los valores de p se calcularon después del ajuste con un modelo multivariable que incluye la edad, la HTA, DM, DL y el hábito tabáquico. El género y los antecedentes familiares de AAA no se incluyeron en el modelo dado que en la muestra todos los pacientes son hombres y ninguno presenta antecedentes familiares de AAA. miRNA: microRNA; p-AAA: plasma de aneurisma de aorta abdominal; p-CTL: plasma de controles.

miRNA	Secuencia de miRNA	Veces de cambio p-AAA/ p-CTL	p valor	Estimado	Intervalo de confianza (95%)
miR-152-3p	ucagugcaugacagaacuugg	1,5	0,357	0,028	-0,032 – 0,087
miR-144-3p	uacaguauagauguacu	1	0,804	- 0,230	-2,081 – 1,621
miR-27b-3p	uucacaguggcuaaguucugc	1,6	0,043*	0,427	0,014 – 0,841
miR-103a-3p	agcagcauuguacagggcuaga	1	0,284	0,528	-0,452 – 1,509
miR-99a-5p	aaccguagauccgaucuugug	1,9	0,183	0,081	-0,04 – 0,201
miR-375	uuuguucguucggcucgcguga	2	0,139	0,075	-0,025 – 0,174
miR-221-3p	agcuacauugucugcuggguuuc	1,9	<0,001**	0,333	0,145 – 0,521
miR-146a-5p	ugagaacugaaauccauggguu	1,6	0,457	0,054	-0,09 – 0,198
miR-1260	auccaccucugccacca	2	0,238	-0,034	-0,034 – 0,132

Los valores de expresión se normalizaron frente a miR-191-5p. Los 9 miRNAs cuantificados presentaron mayor expresión en el grupo p-AAA que en el grupo p-CTL, pero siete de ellos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (miR-152-3p, miR-144-3p, miR-103a-3p, miR-99a-5p, miR-375, miR-146a-5p y miR-1260a) como se muestra en la Figura 8.



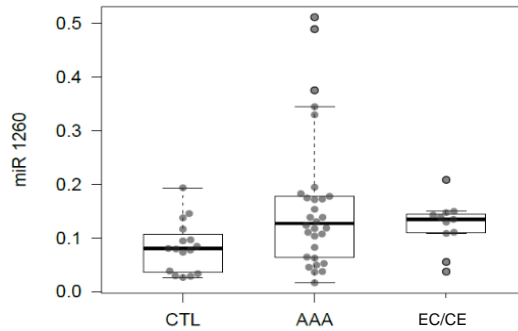


Figura 8. Niveles de expresión ($2^{-\Delta CT}$) de los miRNAs cuantificados y sobreexpresados en el total de las muestras incluidas en el estudio de plasma de controles y AAA, comparados con pacientes con estenosis carotídea. Los valores se han normalizado frente a miR-191-5p (miRNA endógeno estable). Los valores se ajustaron con un modelo de regresión multivariable con los factores de riesgo. No se observaron diferencias significativas. CTL, grupo control (equivalente a p-CTL) (N=16); AAA, pacientes con aneurisma (equivalente a p-AAA) (N=30); EC/CE, pacientes con aterosclerosis severa / *carotid endarterectomy* (N=11).

Sin embargo, y a pesar de las diferencias entre los distintos grupos, tras el ajuste multivariable por los factores de riesgo cardiovascular (edad, HTA, DM, DL y tabaquismo), sí se observó que **miR-27b-3p** y **miR-221-3p** permanecían con una sobreexpresión de 1,6 veces ($P=0,047$, IC95%, 0,014-0,841) y 1,9 veces significativamente mayor ($P=0,001$, IC95%, 0,145-0,521) en el grupo p-AAA que en el grupo p-CTL, respectivamente.

No obstante, estas diferencias significativas no se observaron en los niveles de expresión de estos miRNAs entre los pacientes con p-AAA y el grupo de p-EC/CE; como podemos visualizar en la Figura 9.

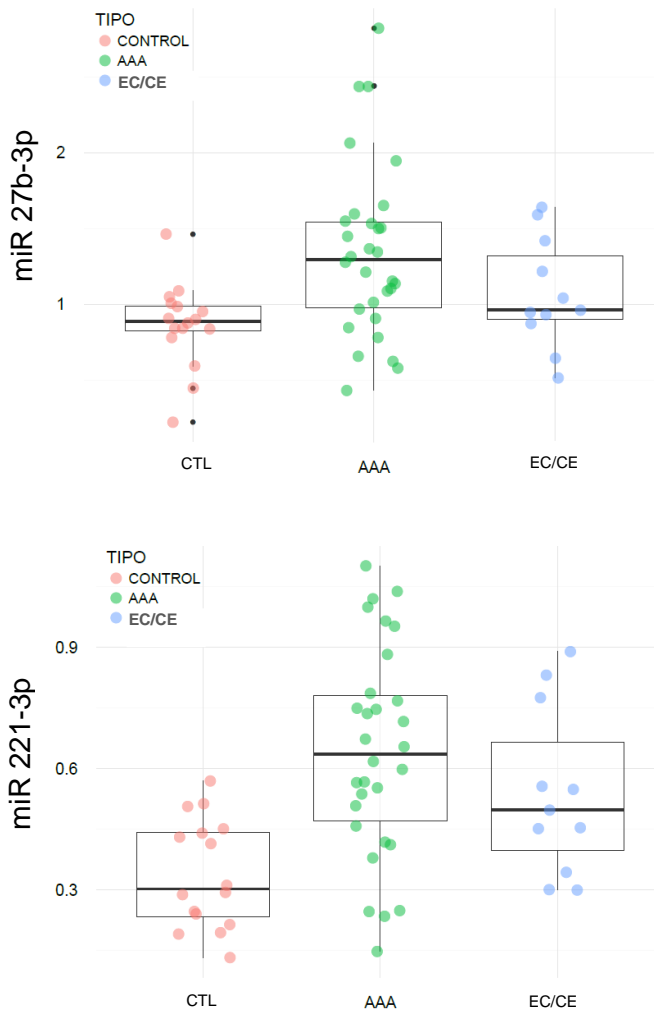


Figura 9. Niveles de expresión ($2^{-\Delta CT}$) de miR-221-3p y miR-27b-3p cuantificados en el total de las muestras incluidas en el estudio de plasma de controles y AAA, comparados con pacientes con estenosis carotídea. Los valores se han normalizado frente a miR-191-5p (miRNA endógeno estable). Los valores se ajustaron con un modelo de regresión multivariable con los factores de riesgo. Se observa la sobreexpresión estadísticamente significativa en AAA frente a controles, aunque no se mantiene al compararlos con los pacientes con estenosis carotídea. CTL, grupo control (equivalente a p-CTL) (N=16); AAA, pacientes con aneurisma (equivalente a p-AAA) (N=30); CE/EC, pacientes con aterosclerosis severa / *carotid endarterectomy* / endarterectomía carotídea (N=11).

6.2 Cuantificación de miRNAs en tejido

Los 11 miRNAs seleccionados previamente en la etapa de cribado realizada en plasma se cuantificaron en un grupo independiente de muestras de tejido aórtico de 21 pacientes (t-AAA) y 8 donantes de órganos como controles (t-CTL), junto con 6 miRNAs seleccionados por su relevancia en la patología: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-21-5p, miR-29b-3p³²⁵ y miR-155-5p³²⁶⁻³³⁴.

Las características de los individuos incluidos en el estudio de tejido se muestran, a continuación, en la Tabla 10.

Tabla 10. Característica de los participantes incluidos en el estudio de tejido (t-AAA). AAA: aneurisma de aorta abdominal; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; DL: dislipemia; AAS: ácido acetil salicílico.

	t-AAA (N=21)
Sexo (hombre)	20 (95'2%)
Edad (desviación estándar)	65'3 (6'5)
HTA	17 (81%)
DM	10 (47'6%)
DL	13 (61'9%)
Tabaquismo	10 (47'6%)
Cirugía abierta	21 (100%)
Diámetro aneurisma (mm)	61'7 (10'9)
Estatinas	14 (66'7%)
Antihipertensivos no betabloqueantes	16 (76'2%)
Antihipertensivos betabloqueantes	6 (28'6%)
AAS	4 (19%)
Otros antiplaquetarios	3 (14'3%)
Anticoagulación	3 (14'3%)

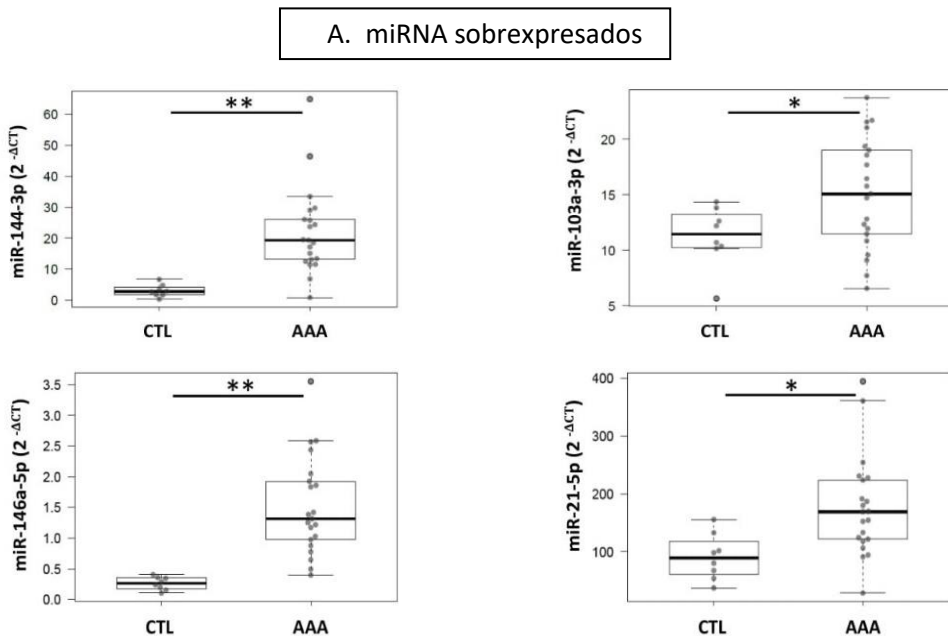
Para el análisis de los miRNAs en tejido se estudiaron miR-191-5p, miR-103a-3p, miR-532-5p y miR-423-5p como miRNAs de referencia, siendo este último el más estable entre muestras y, por tanto, seleccionado para la normalización de los resultados. Los valores de expresión en plasma los observamos en la Tabla 11.

Tabla 11. Niveles de expresión de los miRNA cuantificados en las muestras de tejido (t-AAA y t-CTL). Los valores se normalizaron frente a miR-423-5p. Los valores de p se calcularon después de un ajuste con un modelo de regresión lineal. AAA: aneurisma de aorta abdominal; CTL: controles.

Nombre	Veces de cambio (t-AAA vs t-CTL)	p-valor	Intervalo de confianza (95%)	Nombre	Veces de cambio (t-AAA vs t-CTL)	p-valor	Intervalo de confianza (95%)
miR-221-3p	1,1	0,742	-0,885 – 1,336	miR-195-5p	-1,5	0,023	-4,163 – (-0,333)
miR-27b-3p	-2,0	<0,001	-22,319 – (-8,169)	miR-155-5p	1,9	0,082	-0,043 – 0,676
miR-99a-5p	1,4	0,277	-1,653 – 5,558	miR-21-5p	1,9	0,012	20,360 – 151,689
miR-103a-3p	1,3	0,050	0,007 – 7,705	miR-148a-3p	2,7	0,066	-0,095 – 2,705
miR-146a-5p	5,8	<0,001	0,662 – 1,840	miR-133b	-4,6	<0,001	-3,637 – (-2002)
miR-1260	1,2	0,677	-1,464 – 2,221	miR-133a	-4,4	<0,001	-2,150 – (-1,135)
miR-144-3p	7,2	0,001	8,656 – 29,348	miR-1	-4,4	<0,001	-2,105 – (-1,150)
miR-152-3p	1,1	0,380	-0,320 – 0'813	miR-29b-3p	-1,4	0,018	-6,373 – (-0,645)

La expresión de miR-144-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p y miR-103a-3p fue mayor en el tejido de pacientes con AAA (t-AAA) que en donantes de órganos (t-CTL) 7,2 veces ($p < 0,001$; IC del 95%, 8,656- 29,348), 5,8 ($p < 0,001$; IC 95%, 0,662-1,84), 1,9 ($p = 0,012$; IC 95%, 20,360- 151,689) y 1,3 veces ($p = 0,05$, IC 95%, 0,007-7,705), respectivamente.

Por otro lado, se observó una infraexpresión de miR-1, miR-133b, miR-133a-3p, miR-27b-3p, miR-195-5p y miR-29b-3p en el t-AAA 4,8 veces [$p < 0,001$; IC del 95%, (-2,105) - (1,150)]; 4,6 [$p < 0,001$; IC del 95%, (-3,637) - (-2,002)]; 4,4 [$p < 0,001$; IC del 95%, (-2,150) - (-1,135)]; 2 [$p < 0,001$; IC del 95%, (-22,319) - (-8,149)]; 1,6 [$p = 0,023$; IC del 95%, (-4,163) - (0,333)] y 1,4 veces [$p = 0,018$; IC del 95%, (-6,373) - (-0,645)] con respecto al tejido sano. miR-1260a, miR-375 y miR-7-1-3p se descartaron debido a un bajo nivel de expresión en el tejido (Figura 10).



B. miRNA infraexpresados

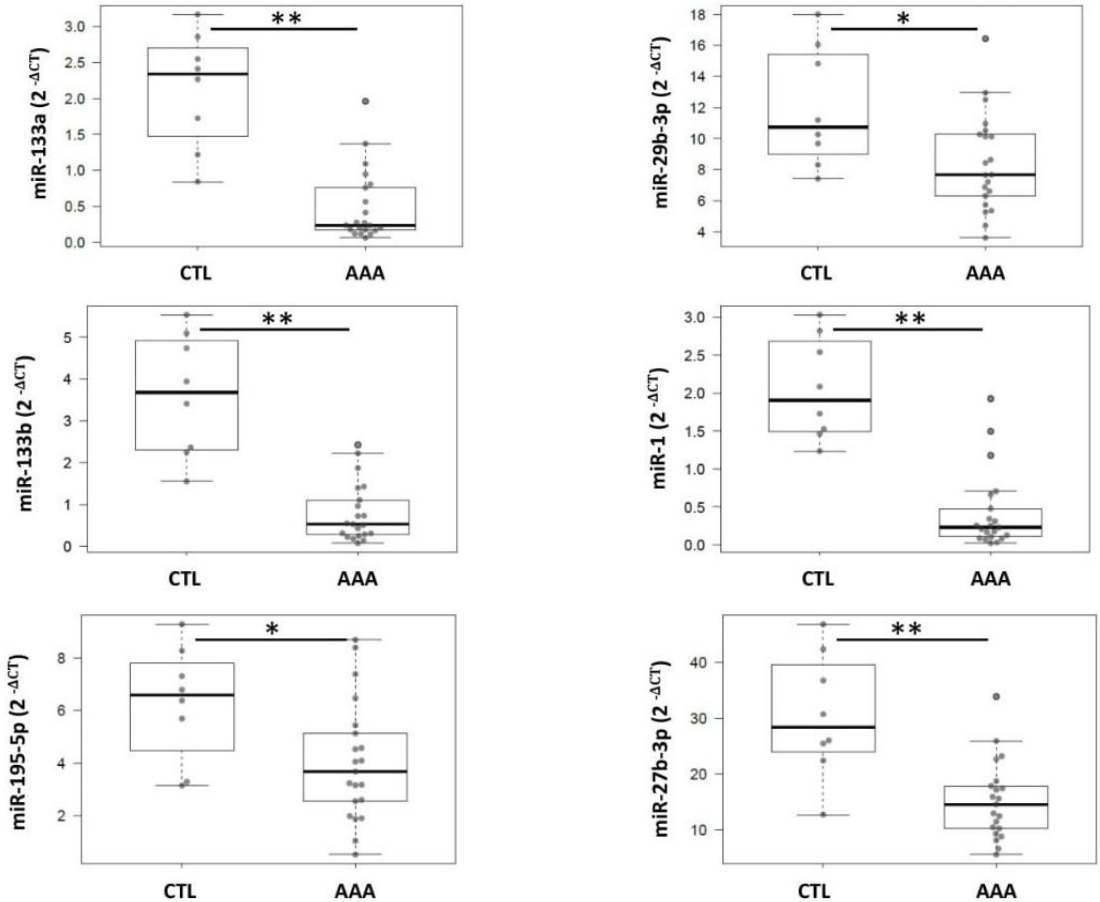


Figura 10. Niveles de expresión calculados como $2^{-\Delta CT}$ de los 10 miRNA disregulados en tejido de pacientes con AAA en comparación con tejido de donantes de órganos. CTL: controles (equivalente a t-CTL) (N=8); AAA: pacientes con aneurisma abdominal (equivalente a t-AAA) (N=21).

Los valores de cada expresión de miRNA se normalizaron con la expresión de un miRNA endógeno y estable (miR-423-5p). Los valores se ajustaron con un modelo de regresión lineal con factores de riesgo. Las diferencias significativas se muestran como *, $p < 0,05$, ** $p = 0,001$. miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-144-3p y miR-103a-3p se sobre expresaron en pacientes con AAA. miR-1, miR-27-b-3p, miR-29b-3p, miR-133a-3p, miR-133b y miR-195-5p estaban infraexpresados en pacientes con AAA.

6.3 Identificación de posibles dianas terapéuticas

Aplicando un GSEA (un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para identificar clases de genes o proteínas que están sobrerrepresentadas en un gran conjunto de estos y que pueden tener una asociación con fenotipos de enfermedades) y, en función de la información del GO, caracterizamos el perfil funcional de los miRNA disregulados de tejido, según sus posibles dianas predichas y validadas. Las principales Componentes Celulares (CC), Procesos Biológicos (BP) y Funciones Moleculares (MF) regulados por sus posibles dianas según esta clasificación se muestran en la Figura 11.

Algunos de los CC más representados, como membrana basal y componentes de la matriz extracelular, así como algunos procesos biológicos como la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), los procesos metabólicos de las especies ROS, la regulación lipídica o la respuesta a estímulos mecánicos, podrían tener relevancia en el contexto de la patología aneurismática.

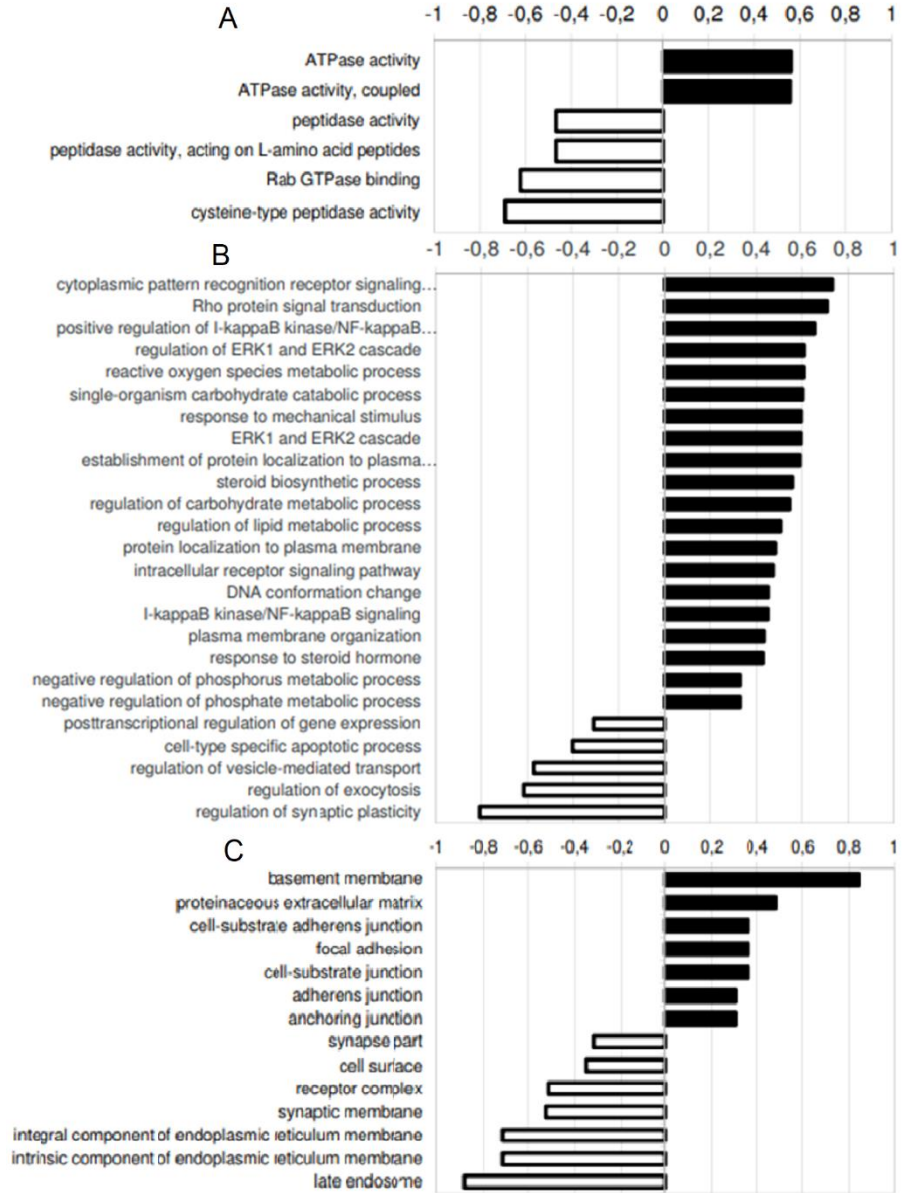


Figura 11. Análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) de 9 miRNA disregulados en tejido de AAA (miR-144-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-103a, miR-1, miR-133b, miR-27b-3p, miR-195-5p y miR-29b-3p). miR-133a no se incluyó en el análisis porque debido a su alta homología con miR-133b, comparten la mayoría de sus dianas. A) Funciones moleculares (MF); B) Procesos Biológicos (BP); C) Componentes celulares (CC) de las dianas los miRNA de disregulados en tejido. Las barras representan el grado de disregulación medido por el Logaritmo de relación (Lor).

A partir del análisis de enriquecimiento, representamos el mapa de interacciones de los miRNAs disregulados en tejido y de sus posibles dianas predichas según las principales bases de datos (Figura 12).

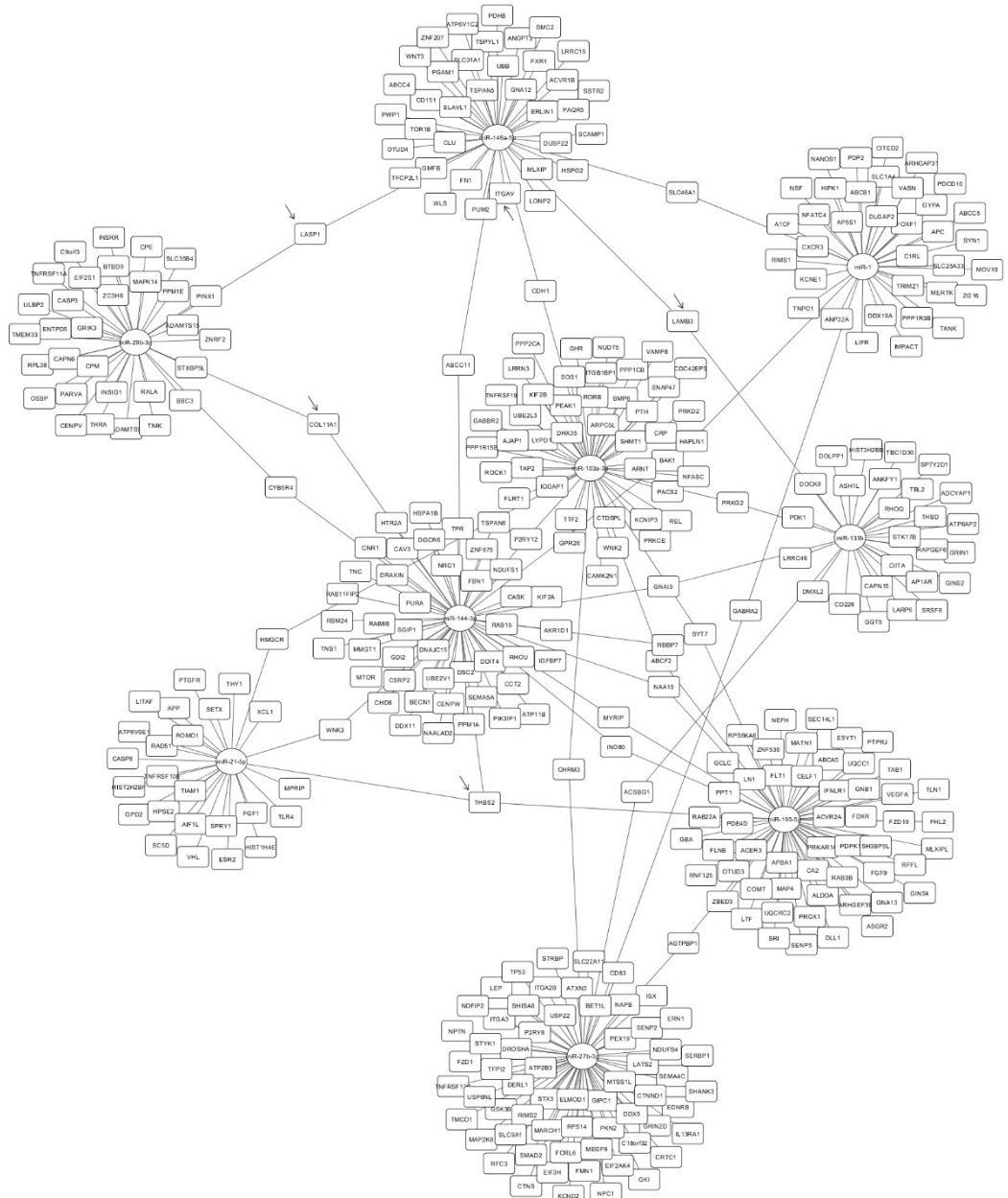


Figura 12. Red de interacción de los 9 miRNA disregulados (mir-144-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-103a-, miR-1, miR-133b, miR-27b-3p, miR-195-5p, miR-29b-3p) en el tejido y sus genes diana después de aplicar GSEA. No se incluyó miR-133a en el análisis debido a que, por su elevada homología de secuencia con miR-133b, comparten la mayoría de las dianas. A cada miRNA se le asignó un coeficiente equivalente a las veces de cambio de los niveles de expresión en tejido. Los miRNAs están representados en círculos y sus posibles dianas en rectángulos. El GSEA proporcionó 376 posibles dianas de las cuales, veinte podrían estar regulados por dos miRNAs y una, la Thrombospondin-2, podría estar regulado por 3 miRNAs. Marcados con flechas encontramos los genes que codifican las proteínas cuantificadas en tejido.

Tras el GSEA se obtuvieron un total de 376 posibles dianas de los miRNAs disregulados en tejido de pacientes con AAA y donantes de órganos. De ellas, 21 genes diana podían estar disreguladas por más de un miRNA y, de ellos, sólo uno, *THBS2*, el gen que codifica a la Trombospondina 2 podía estar regulado hasta por 3 miRNAs (miR21-5p, miR-195-5p y miR-144-3p).

Se revisaron los 376 genes dianas, en función de la categoría del GO en la que estuvieran clasificados, según las rutas biológicas en las que podrían estar participando según KEGG *Pathway* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) y según publicaciones previas con los criterios de búsqueda ([nombre de gen] & [abdominal aortic aneurysm] or [vascular diseases] or [vascular pathology]). De acuerdo a esos criterios se seleccionaron 5 genes para validarlos a nivel de expresión proteica en tejido de pacientes con AAA y donantes de órganos.

6.4 Cuantificación de las posibles dianas de los miRNAs disreguladas en tejido de pacientes con AAA

Dado que la regulación de los miRNAs se produce a nivel postranscripcional, el efecto regulador se debe estudiar a nivel proteico. Así pues, cuantificamos las 5 proteínas seleccionadas: COL11A1 (colágeno XI α 1), LASP1 (proteína 1 del dominio LIM y SH3), LAMB3 (subunidad 3 β de laminina), ITGAV (Integrina subunidad α 5) y THBS2 (Trombospondina-2) en tejido de pacientes con AAA donantes de órganos (t-CTL) mediante *Western Blot*.

COL11A1 y LAMB3 no presentaron niveles cuantificables en nuestras muestras. Como se observa en la Figura 13, LASP 1 e ITGAV presentaron niveles mayores en pacientes que en controles, aunque sin diferencias significativas. Los niveles de THBS2 en tejido arterial fueron significativamente mayores en t- AAA que en t-CTL ($p=0,04$).

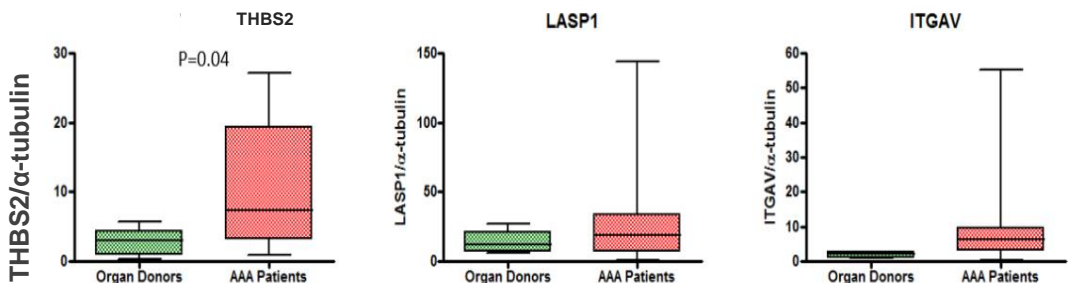


Figura 13. Cuantificación de las dianas mediante Western Blot. THBS2: trombospondina 2; LASP1: proteína 1 del dominio LIM y SH3; ITGAV: integrina subunidad α 5.

Además, se estudió la correlación entre los niveles de las proteínas diana y sus posibles miRNAs reguladores, es decir, la relación de LASP1 con miR-146a-5p y miR-29b-3p; ITGAV con miR-146a-5p y THBS2 con miR-144a-3p, miR-195-5p, y miR-21-5p. Observamos una correlación negativa entre los niveles de THBS2 y miR-195-5p (Tabla 12).

Tabla 12. Correlación diana/miRNA. THBS 2: trombospondina 2; ITGAV: integrina subunidad $\alpha 5$; LASP1: proteína 1 del dominio LIM y SH3.

	THBS2			ITGAV	LASP1	
	miR 195-5p	miR 21-5p	miR 144-3p	miR 146a-5p	miR 29b-3p	miR 146a-5p
p Pearson	-0,665	0,214	0,314	0,412	-0,373	0,251
p (bilateral)	0,0026	0,394	0,205	0,102	0,140	0,331
R²	0,442	0,046	0,099	0,168	0,139	0,063

Además, observamos que esta correlación negativa presentaba una tendencia logarítmica (correlación \log THBS2 y miR-195-5p, p Pearson=-0,76; R²=0,57; p=0,0003) (Figura 14).

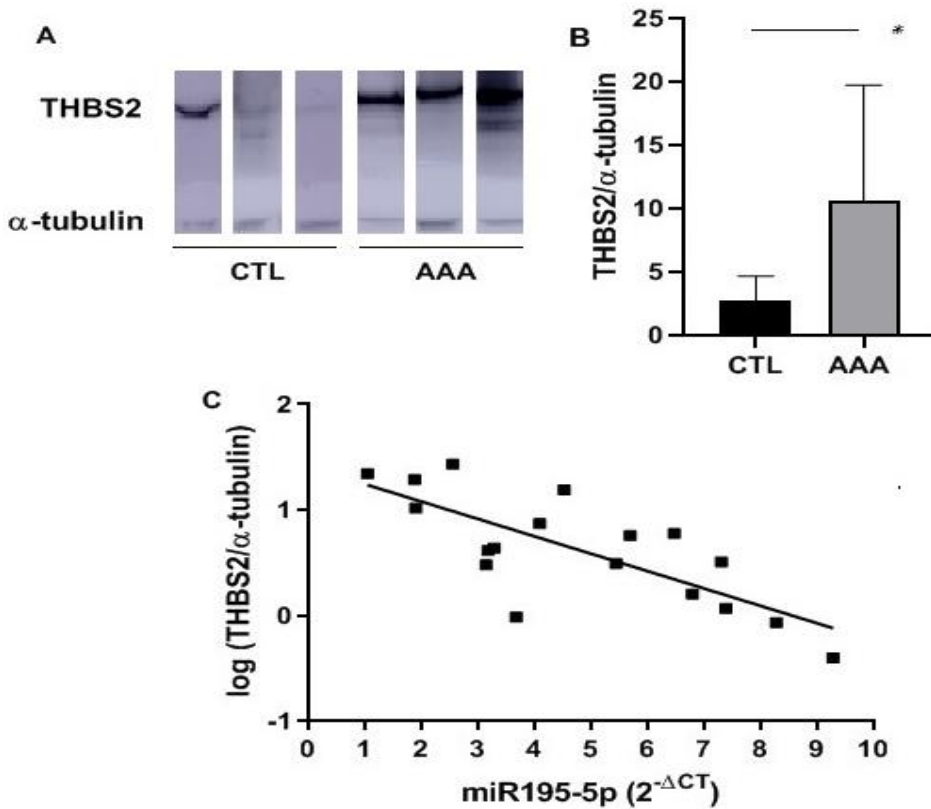


Figura 14. Expresión de THBS2 en muestras de tejido de pacientes con AAA (t-AAA) y donantes de órganos (t-CTL). THBS 2: trombospondina 2; CTL: control (equivalente a t-CTL); AAA: aneurisma de aorta abdominal (equivalente a t-AAA). A) Muestra representativa de las bandas de THBS2 y α -tubulina obtenidas en el Western blot de THBS2 para 3 pacientes con AAA y 3 donantes de órganos; B) niveles de expresión relativa de THBS2 (frente α -tubulina para la normalización) en muestras de tejido de AAA (N=11) y CTL (N=7); C) correlación de los niveles de THBS2 (log (THBS2/ α -tubulina) y la expresión de miR-195-5p en muestras de tejido (N = 28, t-CTL y t-AAA) *, $p < 0,05$.

7 DISCUSIÓN

7.1 Marco teórico actual del papel de los miRNA en la patología aneurismática

Las enfermedades cardiovasculares suponen una de las causas más comunes de mortalidad en los países occidentales. Aunque se ha mejorado sustancialmente en cuanto a la prevención primaria, su prevalencia continúa aumentando. Por este motivo, resulta clínicamente relevante investigar la fisiopatología molecular para aplicarla en la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos ayuden en la prevención y en el diagnóstico precoz de estas enfermedades, así como a seleccionar las poblaciones de riesgo que se beneficiarían de un seguimiento más estrecho.

En concreto, el tratamiento de los AAA, en caso de que lo precisen, consiste en una reparación quirúrgica abierta o endovascular y desafortunadamente, no disponemos de terapias médicas intermedias profilácticas y/o aplicables desde el momento del diagnóstico, que limiten el crecimiento de estos. Se ha sugerido que el tratamiento con diversos fármacos, incluyendo las estatinas¹¹⁵, los betabloqueante¹¹¹⁻¹¹³, la doxiciclina¹¹⁴, incluso la metformina³³⁵ podrían ayudar con esta finalidad.

Sin embargo, los resultados de los distintos ensayos clínicos no han sido concluyentes, quedando únicamente el control de los factores de riesgo, así como la vigilancia periódica del tamaño y velocidad de crecimiento del AAA para indicar su corrección quirúrgica preventiva en caso de riesgo de rotura aumentado (diámetro > 5,5 cm o crecimiento > 1 cm en 1 año)⁹⁶.

La práctica clínica actual carece de un sistema certero que permita distinguir de manera sencilla entre los portadores de AAA y la población sana o individuos en riesgo de desarrollarlo. Tampoco se han detectado marcadores que separen el grupo de pacientes con AAA con riesgo de crecimiento rápido y rotura de los que padecerán una enfermedad más estable. A falta de biomarcadores o parámetros analíticos que permitan el seguimiento pronóstico de la patología y un tratamiento farmacológico específico, existe un interés creciente en la identificación y detección de nuevos marcadores y moléculas para el diagnóstico de los AAA, así como en la identificación de factores genéticos y epigenéticos que contribuyan a su patogénesis. Esto podría permitir una selección de los AAA en expansión, un mayor control de los grupos de riesgo y facilitar el desarrollo de tratamientos para limitar su crecimiento.

Por este motivo, en las últimas décadas se han realizado múltiples estudios para comprender la fisiopatología de esta enfermedad y determinar posibles moléculas plasmáticas que pudiesen ayudarnos con esta finalidad. Entre ellos destacan los marcadores de inflamación, de degradación de la elastina o de la matriz extracelular revisados en el apartado de Antecedentes, destacando entre ellos las metaloproteasas o las ROS.

Por otra parte, el papel de los miRNAs en las patologías cardiovasculares ha suscitado un creciente interés en los últimos años. Sin embargo, su implicación en la formación y desarrollo del AAA y su utilidad como biomarcadores en esta enfermedad todavía no está claro, siendo algunos estudios poco concluyentes o discordantes entre grupos.

Por tanto, son necesarios más estudios que ayuden a esclarecer, no solo el papel de los miRNAs sino también las rutas en las que puedan estar implicados, así como su posible utilidad como biomarcadores y como nuevas dianas terapéuticas.

Por esta razón, nuestro objetivo en el presente estudio consistió en identificar nuevas moléculas (miRNAs) involucradas en el desarrollo de los AAA en humanos y, además, en valorar su potencial como biomarcadores plasmáticos, continuando esta línea de investigación que nos permita una mejor clasificación y tratamiento de nuestros pacientes.

7.2 miRNA circulantes en plasma

Para que una molécula pueda considerarse un buen biomarcador potencial debe presentar una serie de características: poseer protocolos no invasivos de accesibilidad, su determinación debe ser económica a la hora de su cuantificación, ser específica para la enfermedad de interés, extrapolable desde los modelos animales a los seres humanos y precoz en la detección de la enfermedad, previamente a la aparición de las manifestaciones clínicas³³⁶.

En este sentido, se ha observado que los miRNAs son buenos candidatos para su estudio como biomarcadores de diversas patologías como las inflamatorias, infecciosas, cardíacas y oncológicas.

En el caso concreto del AAA, aunque los estudios son prometedores, no existen, hasta la fecha, protocolos estandarizados que permitan la reproducibilidad entre ellos y, aunque se han incrementado en los últimos años, su aplicación clínica todavía necesita estudiarse en profundidad.

El primer estudio publicado en esta línea fue el de Kin *et al*²⁰³, quienes plantearon, en 2012, un patrón de expresión diferencial de miRNAs entre el plasma de pacientes con AAA (n=23), voluntarios sanos (n=12) y pacientes con enfermedad coronaria (n=17), que incluye, entre otros, miR-15a/b, miR-29, miR-124a, miR-126, miR-146a, miR-155 y miR-223. También observaron que estos miRNAs se encontraban ligeramente sobrepresados en plasma de pacientes con aterosclerosis severa, lo que podría reflejar una posible participación en un mecanismo común.

Posteriormente, Zhang *et al*⁸⁰⁴ evaluaron, en 2015, las muestras de plasma de una cohorte de 120 sujetos (60 pacientes con AAA y 60 controles) y encontraron también una expresión diferencial en la que miR-191-3p, miR-455-3p y miR-1281 aparecían sobreexpresados en pacientes con AAA y sugerían su uso como biomarcadores potenciales en el diagnóstico de AAA. A partir de ahí, el estudio de los miRNAs como posibles marcadores de AAA ha ido incrementando en los últimos años. Los resultados más relevantes de los miRNAs circulantes en AAA se han resumido en la Tabla 13.

No obstante, existen discrepancias entre las distintas publicaciones que puede deberse a la variabilidad de las metodologías empleadas para la cuantificación de los miRNAs, al tipo de biofluido estudiado y al anticoagulante utilizado para el almacenamiento de la muestra de sangre, a los métodos de extracción y aislamiento del RNA, a los reactivos y a las condiciones para realizar la RT-qPCR o a la estrategia de normalización utilizada³³⁷. Además de estas causas, la falta de correlación también puede atribuirse al hecho de que el AAA es una patología multifactorial y heterogénea con varias comorbilidades asociadas y variabilidad entre pacientes, lo que dificulta a su vez encontrar y establecer el grupo control más adecuado para comparar los niveles de expresión.

En cualquier caso, la falta de reproducibilidad entre las publicaciones enfatiza la importancia de la estandarización en la metodología y los protocolos usados, así como la necesidad de validación en poblaciones independientes. Además, son necesarios más estudios, en poblaciones más extensas, para validar los resultados obtenidos de los miRNAs como marcadores en tejido y posibles dianas terapéuticas.

Para hacer frente a estas dificultades, en nuestro estudio, hemos utilizado la herramienta RefFinder³¹⁵ para seleccionar un miRNA endógeno y estable dentro de un grupo de candidatos. Este *software* comprende los resultados de los algoritmos más comúnmente empleados y se ha diseñado y desarrollado para evaluar y cribar genes de referencia de extensos conjuntos de datos experimentales. Tras una revisión exhaustiva de la bibliografía, hemos observado que éste es, probablemente, el único estudio sobre miRNA circulantes en AAA en el que la elección del miRNA endógeno de referencia se ha justificado previamente de acuerdo con su expresión estable entre las muestras estudiadas.

Como resultado de esta estrategia, en nuestro estudio, hemos identificado 7 miRNAs (miR-27b-3p, miR-103a-3p, miR-375, miR-146a-5p, miR-1260a, miR-221-3p y miR-99a-5p) que presentaron mayor expresión en plasma en el grupo de pacientes con AAA en comparación con el de voluntarios sanos.

Tras el ajuste multivariable por los factores de riesgo cardiovascular (edad, HTA, DL y DM), se observó que dos de ellos (miR-27b-3p y miR-221-3p) permanecían sobreexpresados de manera significativa 1,6 y 1,9 veces respectivamente, en AAA frente a los controles sanos.

Aunque, tras revisar la bibliografía, nuestro estudio parece ser el primero que relaciona el aumento de miR-27b-3p en el plasma de pacientes con AAA respecto a controles sanos, otros muchos lo han asociado previamente con múltiples patologías cardiovasculares e inflamatorias. Zhou *et al*³⁸ lo describieron por primera vez como marcador inflamatorio en modelos murinos en 2017. En el mismo año, Dolz *et al*³⁹ publicaron sus resultados tras el análisis del plasma de 39 pacientes en los que relacionaron un aumento de este miRNA con la progresión de la estenosis carotídea asintomática.

Posteriormente, Chen *et al*⁴⁰ también observaron un aumento de miR-27b-3p en suero de 77 pacientes dentro de las 24 primeras horas tras sufrir un ictus frente a 42 controles sanos. Finalmente, también se ha descrito una posible relación de los niveles circulantes de este miRNA con la TVP inicial y la TVP recurrente. Wang *et al*⁴¹, en 2019, compararon el plasma de 39 pacientes con un primer episodio de TVP y 39 con TVP recurrente, observando una sobreexpresión de este miRNA en el segundo grupo de pacientes. Estos hallazgos han sido confirmandos por Thibord *et al*¹³ en 2020 tras analizar el plasma de 344 pacientes con TVP.

Así pues, estos resultados refuerzan, junto a los nuestros, la posible implicación del miR-27b-3p en la patología aterotrombótica y su potencial valor como marcador circulante, aunque su relación directa y específica con el AAA necesita seguir estudiándose en profundidad.

Por otro lado, **miR-221-3p** regula la inflamación y la angiogénesis mediante el control de la migración, la proliferación y el crecimiento de las células endoteliales y las VSMC³⁴²⁻³⁴⁴. Se ha visto previamente relacionado con la respuesta inmunológica²¹⁹, la patología cardíaca^{216, 345} entre la que destaca la angina vasoespástica²²³ y otros factores de riesgo cardiovascular como la diabetes primaria y la gestacional³⁴⁶ o el metabolismo lipídico²²⁵, entre otras.

Con respecto a su valor como marcador circulante del AAA, Wanhainen *et al*⁶⁴⁷ estudiaron la expresión de 172 miRNAs en 169 pacientes con AAA, 85 con crecimiento rápido y 84 con crecimiento lento (pareados por diámetro basal), y 48 controles sanos pareados por edad. Observaron 103 miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con AAA frente a los controles. Además, 20 de estos miRNAs mostraban un patrón de expresión diferente entre los pacientes con crecimiento rápido y los de progresión más lenta. En concreto el **miR-221-3p**, presentó sobreexpresión en plasma de pacientes con AAA de crecimiento rápido. Sin embargo, este miRNA no se incluyó en el modelo predictivo propuesto por Wanhainen, en el que la inclusión de miRNAs mejoraba la sensibilidad de los modelos desarrollados únicamente con factores de riesgo y diámetro basal. No obstante, estos resultados, junto con los aportados en nuestro estudio, sugieren el valor del miR-221-3p como potencial marcador de patología aneurismática, que podría ayudarnos en la práctica clínica a la hora de estratificar el riesgo de los pacientes, de forma aislada, o en combinación con otros parámetros clínicos.

Además, en el presente estudio también hemos observado que tanto miR-27b-3p como miR-221-3p, se encontraban ligeramente sobreexpresados en plasma de pacientes con aterosclerosis severa, lo que podría reflejar una posible participación en un mecanismo común. En una revisión sistemática publicada en 2018 por Pereira da Silva *et al*⁶⁴⁸ y que incluía 18 estudios (10 de ellos enfocados al estudio de la arterioesclerosis carotídea, 6 a la enfermedad arterial periférica de MMII y 2 a la patología arterioesclerótica renal), se identificó un perfil de miRNAs común para diferentes ubicaciones de enfermedades arterioescleróticas, que incluían la disregulación de **miR-27-3p**, miR-21, miR-30, miR-126 y **miR-221-3p**, relacionándolos con el desarrollo de la aterosclerosis en estos sectores arteriales. Además, en la excelente revisión de Chen *et al*⁶⁴⁹ se postula que la familia del miR-27b-3p se asocia al control de diversas funciones biológicas relacionadas y presentes tanto en AAA como en aterosclerosis, tales como la angiogénesis, la actividad de las células endoteliales, la respuesta inmune e inflamatoria, el metabolismo lipídico, el estrés oxidativo, la composición de la MEC o la resistencia a la insulina.

Por tanto, la elevación de miR-27b-3p y miR-221-3p en pacientes arteriosclerosos y en pacientes con AAA podría ser un reflejo de estos mecanismos comunes descritos.

De forma similar a los hallazgos de nuestro estudio, otros autores han observado que miRNAs disregulados en AAA también lo están en patología aterosclerótica. Así pues, Stather *et al*⁶⁵⁰, en su estudio sobre la expresión de 754 miRNAs en 15 pacientes con AAA y 10 voluntarios sanos, observaron una disregulación de los niveles circulantes de let-7e, miR-15a, miR-196b y miR-411 en pacientes con AAA. Al validar la expresión de estos miRNAs en una cohorte que incluía 40 controles sanos, 40 individuos con patología arterial periférica, 40 pacientes con AAA de pequeño tamaño y 40 pacientes con AAA de gran tamaño, observaron que dichos miRNAs presentaban un patrón similar entre los pacientes con AAA y enfermedad arterial periférica concluyendo que el estudio de la modulación de estos miRNA y sus dianas podría ser útil en la investigación de nuevas vías terapéuticas para controlar la progresión de los AAA y la arterioesclerosis

Por tanto, aunque en un principio, el hecho de observar un aumento de miR-27b-3p y miR-221-3p podría considerarse como una limitación, ya que no se trataría de miRNAs altamente específicos de AAA, esto podría indicar que varios biomarcadores podrían ser comunes en los procesos desencadenantes de determinadas enfermedades cardiovasculares. Estos resultados podrían ser útiles para intentar dilucidar los mecanismos subyacentes comunes en todas ellas y comprender mejor la relación la fisiopatología de la arterioesclerosis y los AAA.

Por otra parte, como ya se ha comentado, un miRNA puede estar implicado en varias rutas metabólicas, por lo que la búsqueda de un único miRNA como marcador de patología no parece ser el abordaje más apropiado. Su combinación con otros biomarcadores como las MMP, o el diámetro aórtico basal, podrían suponer una herramienta complementaria para el diagnóstico o estratificación de pacientes con AAA.

Finalmente, la falta de correlación entre los distintos estudios publicados podría atribuirse, como ya hemos comentado previamente, al hecho de que los AAA son una patología multifactorial y heterogénea con varias comorbilidades asociadas y variabilidad entre pacientes, lo que dificulta también encontrar y establecer el grupo control más adecuado para comparar los niveles de expresión. En cualquier caso, las discrepancias entre las publicaciones destacan de nuevo la importancia de la estandarización en la metodología y los protocolos usados, la necesidad ampliar y continuar estudios, así como la validación de los resultados existentes en poblaciones independientes.

Tabla 13. Resumen de los estudios más relevantes de expresión de miRNA circulantes en AAA. Extraído de Iyer *et al*^{β00}. AAA: aneurisma de aorta abdominal; TC: tomografía computerizada; EAP: enfermedad arteria periférica; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; FRCV: factores de riesgo cardiovascular.

	Año	Casos	Controles	Tipo de muestra	miRNA	Disregulación
K. Kin	2012	AAA (no definido) n=23	Enfermedad carotídea (no definida) n=17 Controles sanos n=12	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-155 miR-15a miR-15b miR-29b miR-223	Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado
A. Zampetaki	2014	Pacientes masculinos con AAA (programa de <i>screening</i> , AAA no definido) n=22	Controles sin AAA pareados por género, HTA y DM (exclusión de AAA no definida). n=22	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-125b miR-148a miR-195	Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado
E. Biros	2014	AAA grandes (> 50 mm), suero n=10	Pareados por edad y género no AAA (TC <30mm) pero con EAP MMII. n=10	Muestras de sangre periférica. Análisis del suero.	miR-155	Infraexpresado
L. Maegdefessel	2014	AAA (> 45 mm) n=105	Controles pareados por edad, medicación y FRCV con función renal/hepática normal n=52 Pacientes con EAP (no definido el diagnóstico) n= 22 (AAA excluido mediante ultrasonido)	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	Ninguno	Resultados no significativos

	Año	Casos	Controles	Tipo de muestra	miRNA	Disregulación
R. Spear	2015	AAA (> 50mm o crecimiento > 10mm) n=20	Ausencia de AAA (excluido por ultrasonido) con EAP aortoiliaco/femoral. n=17	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-15a miR-30a-5p	Infraexpresado Infraexpresado
PW. Stather	2015	<i>Screening:</i> AAA grandes (> 55mm) n=15 Validación: AAA (> 30 mm) n=20 (También grupo EAP definido por claudicación + hallazgos ecográficos, n=40, no incluidos en esta revisión)	<i>Screening:</i> controles sanos (AAA excluido mediante ultrasonido) Validación: post-AAA reparación, controles sanos no AAA (excluido mediante ultrasonido), controles EAP (claudicación + hallazgos ecográficos). n=120 (40, 40, 40)	Muestras de sangre periférica. Análisis de sangre total en screening y de sangre total y plasma en validación.	miR-15a miR-15b miR-29b miR-148b miR-374a miR-181a miR-125a miR-125b miR-19a	Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado

Estudio de miRNAs en la formación de AAA en humanos

	Año	Casos	Controles	Tipo de muestra	miRNA	Disregulación
W. Zhang	2015	AAA (dilatación focal > 50% del diámetro normal en TC) Screening n=10 Validación n=60	Controles sanos (AAA excluido mediante ultrasonido) Screening n=10 Validación n=60	Muestras de sangre periférica. Análisis de plasma combinado.	Ninguno	Resultados no significativos
S. Licholai	2016	AAA (reparación quirúrgica electiva) n=52	EAP, revascularización quirúrgica electiva (no definido como se excluyó AAA) n=51	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-29c-3p	Sobrexpresado
A. Wanhainen	2017	Pacientes masculinos con AAA (≥ 30 mm, seguimiento ≥ 6 meses, reducción ≤ 5 mm) n= 169 (85 clasificados como lento crecimiento, 84 como rápido)	Controles sin AAA (excluido mediante ultrasonido) n=48	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-15a miR-15b miR-223 miR-29c-3p miR-30a-5p miR-19a miR-148b miR-125b miR-148a miR-155 miR-181a miR-374a miR-125a miR-195	Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado
E. Plana	2020	Pacientes masculinos con AAA Screening n=7 Validación n=30	Controles sanos (AAA excluido mediante ultrasonido), n=16 Control estenosis carotídea significativa, n=11	Muestras de sangre periférica. Análisis del plasma.	miR-27b-3p miR-221-3p	Sobrexpresado Sobrexpresado

7.3 miRNAs en tejido

Conocer los miRNAs alterados en muestras tisulares de pared aórtica, además de en plasma, nos podría dar una información muy relevante para poder comprender mejor la fisiopatología, la historia natural y las vías implicadas en el desarrollo de AAA. La coincidencia en su disregulación permitiría confirmar su papel como factores de riesgo y, eventualmente, ofrecer un tratamiento clínico más individualizado. La Tabla 14 resume los resultados más relevantes publicados hasta la fecha sobre miRNAs en tejido de pacientes con AAA.

En base a los resultados obtenidos en la etapa de cribado en plasma de nuestro estudio, junto con una revisión exhaustiva en la bibliografía, seleccionamos 17 miRNA que cuantificamos en la pared aórtica de pacientes con AAA y en tejido aórtico sano de donantes de órganos tanto para validar y confirmar las disregulaciones halladas en plasma como para validar los resultados previamente descritos por otros autores. Seis de estos miRNAs aparecieron infraexpresados (miR-133a, miR-133b, miR-1, miR-195-5p, miR-29b-3p, miR-27b-3p) y cuatro, sobreexpresados (miR-103a-3p, miR-146a-5p, miR-144-3p, miR-21-5p) en las muestras quirúrgicas de AAA (Tabla 11).

Con respecto a los miRNAs infraexpresados, hemos observado una disminución de los niveles de **miR-133a**, **miR-133b** y **miR-1** muy similar, de entre -4,4 y -4,6 veces en tejido de pacientes con aneurismas respecto a los valores de expresión en tejido de donantes de órganos. Estos miRNAs han sido ampliamente estudiados en otras patologías cardiovasculares como en la isquemia miocárdica²⁵⁷, la enfermedad de Chagas³⁵¹, la remodelación auricular y diversas arritmias³⁵². Por lo que respecta al AAA, nuestros resultados concuerdan con los de Pahl *et al*⁸², que también observaron una disminución de miR-133a y miR-133b al comparar el tejido de 41 pacientes con AAA con 12 muestras de tejido arterial obtenido de autopsias. En la misma línea, Araujo *et al*⁸³ confirmaron estos resultados al observar también una infraexpresión de miR-133a y miR-133b en un array de expresión de 6 muestras de tejido de pacientes con AAA frente a 6 muestras de tejido arterial de donantes de órganos, aunque, posteriormente, no los seleccionaron para su validación en una cohorte independiente.

Aunque en estos estudios no se hace referencia al miR-1, se sabe que miR-1 y miR-133a se expresan en el mismo clúster cromosómico³⁵⁴ (estructura citogenética que recoge todos los genes que componen una familiar multigénica en una localización del mismo cromosoma), por lo que tiene sentido que los niveles de expresión y regulación de miR-1 y miR-133a presenten niveles similares

Con respecto a la posible función de **miR-133a**, **miR-133b** y **miR-1** en el estudio de Pahl *et al*²⁸² se sugería su implicación en el desarrollo del AAA a través de la regulación del balance proliferación/apoptosis de las CMLV, puesto que se observaba un alto recambio celular en aortas patológicas. En otros estudios adicionales en cultivos celulares, se ha observado que una disminución de los niveles de miR-133a y miR-133b favorece el remodelado vascular y el cambio fenotípico de las CMLV de contráctil a proliferativo³⁵⁵, fenómeno observado en patologías que implican daño vascular como el AAA y la aterosclerosis.

Por otro lado, **miR-195-5p**, que tiene como dianas los genes que codifican algunas de las proteínas de la MEC y a las MMPs, también apareció infraexpresado -1,5 veces en tejido de pacientes con AAA. En un estudio previo, Zampetaki *et al*⁶⁰³ observaron una disminución de miR-195-5p en plasma de pacientes con AAA con respecto a controles sanos. Detectaron, además, una correlación negativa con el diámetro aórtico al analizar los niveles de dicho miRNA en todos los pacientes participantes en su programa de screening (n=73). Sin embargo, en lo referente a los niveles de este miRNA en tejido, nuestros resultados difieren de otros anteriormente publicados. Así, Liang *et al*⁶⁶⁸ describen un aumento de este miRNA en tejido de pacientes con AAA frente a controles, mientras que Araujo *et al*⁶⁵³ no observan diferencias significativas. No sabemos a qué podrían deberse, en este caso, las discrepancias observadas entre los distintos trabajos, no obstante, estudios *in vitro* y en animales de experimentación han atribuido al miR-195-5p funciones opuestas en el desarrollo del AAA.

Así, Liang *et al*²⁶⁸ le atribuyen un papel de inductor a través de la disminución de su diana Smad 3, un regulador de la vía TGF- β , cuya inhibición se ha relacionado con la formación de los AAA. Por el contrario, Ma *et al*²⁶⁶, sugieren un papel protector del miR-195-5p, principalmente debido a una acción antiinflamatoria a través de las vías TNF- α y VEGF. Por tanto, es interesante continuar explorando el posible papel del miR-195-5p y esclarecer su posible implicación en la fisiopatología de los AAA.

El papel de **miR-29b-3p** ha sido ampliamente explorado *in vitro* y en modelos murinos, pero su posible papel en el desarrollo de AAA todavía sigue siendo controvertido. Una de sus funciones más estudiadas es la de modular la respuesta fibrótica de la pared aórtica a través de la regulación de los genes codificadores de diversas isoformas del colágeno (COL1A1, COL1A2, COL3A1)^{270,272}, así como de la fibrillina-1 (FBN1)^{183,271} y la elastina (ELN)²⁷³.

En nuestro estudio hemos observado una infraexpresión de este miRNA -1,4 veces en tejido aneurismático respecto a tejido sano. Esto se ha podido observar también en modelos murinos (de infusión de PPE, elastasa pancreática porcina, en ratones C57BL/6 y de infusión de AngII en ratones ApoE^{-/-}).

En el estudio publicado por Maegdefessel *et al*²⁶⁶ observaron que miR-29b fue el único de la familia de miR-29 que aparecía infraexpresado tanto en la fase de formación como en la de desarrollo de los AAA *in vivo* en estos modelos.

En otro estudio del mismo grupo, se observó un patrón similar de infraexpresión de miR-29b y un aumento de expresión de sus genes diana *in vitro* en cultivos celulares de aorta humana en comparación con el de los controles de donantes de órganos. Además, en esta investigación, se proponía a los fibroblastos aórticos como el tipo de célula vascular mediadora de los efectos profibróticos de miR-29b. Finalmente, en este estudio de Maegdefessel se corroboran estos resultados (la disminución de los niveles de miR-29b y el aumento de la expresión de los genes de colágeno) en muestras de tejido aórtico humano de pacientes con AAA (n=15) con respecto a donantes de órganos sin AAA (n=5), lo que concuerda con lo observado en nuestro trabajo.

Estos datos podrían sugerir que la manipulación terapéutica de miR-29b y sus genes diana podría ser una estrategia prometedora para limitar la progresión de la enfermedad de AAA y proteger de la rotura.

En contraste con nuestros hallazgos y los de Maegdefessel, Kin *et al*²⁰³ detectaron una sobreexpresión de miR-29b en tejido de pacientes con AAA sometidos a cirugía de reparación aórtica (n=13) al compararlo también con pacientes sometidos a cirugía de reemplazo valvular (n=7). Sin embargo, los miRNAs que detectaron sobreexpresados en tejido, aparecieron significativamente infraexpresados en el plasma de pacientes con AAA al compararlos con controles sanos y con pacientes con enfermedad coronaria.

Es probable que la diferencias en los resultados se pueda deber a la disparidad respecto al muestreo, factores de riesgo asociados de los pacientes seleccionados, la gravedad de la dilatación aórtica o la posible inclusión sustancial de trombo o placa de ateroma durante la extracción de tejido.

Finalmente, hemos observado una infraexpresión de los niveles tisulares de **miR-27b-3p** a la mitad en pacientes con AAA respecto a donantes. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por Černá *et al*¹⁷, quienes observaron una infraexpresión de miR-27b-3p en aneurismas de gran tamaño (n=6) respecto a AAA de pequeño tamaño (n=10) y al compararlo con controles sanos (n=5). Estos autores apoyan la hipótesis de que la infraexpresión de los miRNAs de la familia miR-23/27/24 promueve una disregulación de la angiogénesis, controla la proliferación, función y apoptosis de las células musculares lo que, junto con su efecto proinflamatorio, puede contribuir al desarrollo o progresión del AAA.

Sorprendentemente, aunque en nuestro estudio miR-221-3p y miR-27b-3p aparecían elevados en plasma de pacientes con AAA, en tejido hemos observado una disminución de miR-27b-3p y no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de miR-221-3p.

Otros autores también encuentran discrepancias entre los niveles de expresión plasmáticos y tisulares de determinados miRNAs. Así, Kin *et al*²⁰³ observaron que algunos miRNAs que estaban sobreexpresados en el tejido de AAA, tales como miR-29b, miR-124a, miR-155 y miR-223, aparecían reducidos de manera significativa en el plasma de pacientes con AAA respecto a controles sanos. En este estudio se postula una hipótesis para explicar esta dinámica en la que las disregulaciones locales son más acentuadas y que los miRNAs circulantes reflejan un estado sistémico que no es un fiel reflejo de lo que ocurre a nivel local.

Es necesario, por tanto, realizar investigaciones adicionales *in vitro* y en animales de experimentación, así como estudios en muestras pareadas (tejido/plasma) en humanos para elucidar el origen de estas discrepancias observadas.

Con respecto a los miRNAs con expresión aumentada en tejido de pacientes con AAA, hemos visto una ligera sobreexpresión de **miR-103a-3p** de 1,3 veces en tejido de AAA frente a controles. Hasta la fecha, no se ha publicado ningún artículo en el que se cuantifique la expresión de 103a-3p en tejido humano procedente de AAA. Sin embargo, Jiao *et al*⁸⁵⁷ estudiaron el posible papel de este miRNA en un modelo murino *in vitro* de AAA inducido por Angiotensina II. Observaron que una disminución en el miR-103a-3p junto con un aumento de la expresión proteica de una de sus dianas ADAM10 (proteína que contiene el dominio de desintegrina y metaloproteína 10) que podrían estar relacionadas con la formación y el desarrollo de los AAA.

En este artículo además postulan que un aumento en miR-103a-3p podría tener un efecto protector frente al AAA al disminuir la expresión de ADAM10. La sobreexpresión de miR-103a-3p observada en nuestras muestras de tejido podría deberse, por tanto, a la activación de una respuesta compensatoria sólo detectable en fases más tardías de la patología ya que, al contrario que en los modelos murinos en los que se estudian las etapas iniciales de la formación de AAA, las muestras obtenidas en humanos corresponden a un estado avanzado de la enfermedad.

En nuestro estudio, **miR-146a-5p** y **miR-144-3p** presentaron las mayores diferencias de expresión entre pacientes y controles, apareciendo sobreexpresados 5,8 y 7,2 veces, respectivamente (Tabla 11).

Con respecto a **miR-146a-5p** nuestros resultados concuerdan con la mayoría de los grupos. El primer estudio realizado en humanos en el que se observó un aumento de miR-146a-5p en tejido fue el de Kin *et al*²⁰³, en el que se vio esta diferencia al comparar las muestras de tejido de 13 pacientes intervenidos para reparación de AAA frente al tejido de aorta de 7 pacientes intervenidos para sustitución valvular aortica.

Posteriormente, Pahl *et al*²⁸² observaron los mismos resultados al comparar 12 muestras de controles con 41 muestras de tejido aórtico con AAA reparado quirúrgicamente. Venkatesh *et al*⁵⁸ también detectaron un patrón diferencial de miRNAs alterados en AAT (n=11) y AAA (n=3) frente a controles (n=8) en el que observaron una sobreexpresión de miR-146a solo en pacientes con AAA.

Finalmente, Zhang *et al*³⁵⁹ también registraron una sobreexpresión de este miRNA en suero y tejido aórtico de pacientes con AAA. En este último trabajo se plantea la hipótesis de que miR-146a suprime factores de inflamación en sangre periférica (TNF- α , IFN- γ y PCR) en pacientes con AAA al dirigirse a CARD10 (proteína 10 de reclutamiento de caspasas) y bloquear la progresión de los AAA a través de la vía CARD10/SIRT1/p65.

El miR-146a-5p es uno de los miRNAs más estudiados *in vitro* y en modelos animales en cuanto a su relación con la formación y el desarrollo del AAA, particularmente a través de la respuesta inflamatoria mediante la regulación de la expresión de las citoquinas. Tras un estímulo bioquímico producido por TNF- α , se induce la expresión de miR-146a/b, lo que regula TRAF-6 (proteína de la familia de las *TNF receptor associated factor*) que interactúa con la quinasa IRAK-1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*)³⁶⁰⁻³⁶².

Además, este miRNA puede regular los cambios fenotípicos en los macrófagos (M1/M2) desde el fenotipo de activación clásica (M1) al de activación alternativo / reparador (M2) y mediar el transporte de lípidos y la liberación de citoquinas³⁶³. También se ha relacionado con la migración y proliferación de las CMLV³⁶⁴. Finalmente, miR-146a-5p se expresa tanto en las células endoteliales como en las células sanguíneas para inducir una respuesta inflamatoria celular y proteger los vasos sanguíneos, respectivamente.

Por otro lado, en lo que respecta al **miR-144-3p**, sólo un estudio reciente publicado por Lareyre *et al*^{β19} exploró sus niveles en tejido de AAA. En este estudio se incluyeron 10 pacientes diabéticos con AAA y se compararon con 10 pacientes no diabéticos con AAA. Se realizó un análisis de 752 miRNAs tanto en las células mononucleares de sangre periférica como en tejido. Se observó una sobreexpresión de miR-144-3p, entre otros, en pacientes con AAA y diabetes, frente a los no diabéticos, por lo que se postuló una relación entre el aumento de miR-144-3p y la diabetes en pacientes con AAA.

También se ha sugerido una relación entre el miR-144-3p y los mecanismos de aterogénesis, lo que podría relacionarlo de manera indirecta con el AAA. En un estudio publicado por Hu *et al*^{β65} realizado en modelos murinos que incluían 40 ratones (20 controles, 20 ApoE^{-/-}) sugería que el miR-144-3p podría regular ABCA1 (*ATP Binding Cassette transporter A1*) en los macrófagos, lo que podría contribuir a la formación de la placa de aterosclerosis al alterar el transporte inverso del colesterol y al promover la producción de citoquinas proinflamatorias.

Así pues, miR-144-3p podría estar relacionado con el desarrollo de los AAA a través de la inducción de la arterioesclerosis o por su interferencia en las vías del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, los estudios aún son escasos para extraer conclusiones sólidas y su posible implicación en la patología debería estudiarse más a fondo.

Finalmente, hemos observado una sobreexpresión de **miR-21-5p** de 1,9 veces en tejido de pacientes con AAA. En el caso de este miRNA sí parece haber una relación clara en la mayoría de los estudios publicados, en los que se ha detectado una sobreexpresión en tejido de AAA.

Nuestros hallazgos concuerdan con la mayoría de las publicaciones previas, ya comentadas, en las que se identificó miR-21 como un modulador clave en la proliferación y apoptosis de las CMLV durante el desarrollo de los AAA. Entre ellos aparecen los publicados por Kin *et al*²⁰³ y por Pahl *et al*²⁸² en los que se objetivó una sobreexpresión de miR-21-5p en tejido aneurismático de AAA en humanos; el publicado por Maegdefessel *et al*²⁶⁵ en modelos murinos y tejido aórtico humano en los que la expresión de este miRNA aumentaba a medida que se desarrollaba el AAA; y el publicado por Cheuk *et al*²⁸⁸ en el que aparecía una sobreexpresión de este miRNA en CMLV humanas de muestras quirúrgicas de AAA.

Únicamente, el grupo de Busch *et al*⁶⁰⁵ observó en sus estudios una infraexpresión de este miRNA al comparar la actividad de miR-21 en 42 muestras de AAA frente a 12 aortas ateroscleróticas no aneurismáticas. Además, se observó que la regulación de miR-21 dependía del estado inflamatorio de la pared. En este estudio también se incluyeron 8 muestras de aneurismas poplíteos. En este caso, sí se observó sobreexpresión de miR-21-5p respecto a tejido no aneurismático.

miR-21-5p es uno de los primeros que se relacionó con la remodelación vascular. Se ha sugerido que el aumento de miR-21-5p podría ser consecuencia de la respuesta fisiológica para contrarrestar el desarrollo de la enfermedad aneurismática ya que, en modelos animales, Maegdefessel *et al*²⁶⁵ publicaron que un aumento de miR-21 ejercía un efecto protector sobre el desarrollo del AAA inducido por nicotina, mientras que un el bloqueo de su acción con un antimiR aumentaba el desarrollo de esta patología. La sobreexpresión lentiviral (portador de la transfección) de miR-21 induce la proliferación celular y disminuye la apoptosis en la pared aórtica, con efectos protectores sobre la expansión del AAA. En este mismo estudio, sugieren que una de las vías de acción de miR-21-5p sería a través de la disminución de los niveles de una de sus dianas, PTEN (homólogo de la fosfatasa y la tensina). Un incremento de miR-21-5p conduce a una disminución de PTEN, lo que provoca un incremento de la fosforilación y activación de AKT, con marcada acción antiapoptótica, disminuyendo la muerte de las CMLV en la pared vascular y por tanto protegiendo de la degradación aórtica.

Además, también se ha visto sobrepresado en las células endoteliales, donde podría estar regulado por la tensión de cizallamiento. En el estudio de Wei *et al*⁶⁶ se postula que varias enfermedades cardiovasculares, como la reestenosis, la patología aneurismática y la aterosclerosis, conducen a una remodelación vascular asociada con reacciones adaptativas complejas de diferentes poblaciones celulares. Estas reacciones incluyen desde el crecimiento de las CMLV, hasta la proliferación de células endoteliales, pasando por la respuesta inflamatoria de los macrófagos. Estos autores revisaron los mecanismos moleculares de un subconjunto de miRNA involucrados en la remodelación vascular, incluidos miR-143/145, miR-221/222, miR-126, miR-21 y miR-155. Demostraron que algunos de estos miRNA, como miR-143/145 y miR-126, son protectores durante la remodelación vascular, mientras que otros, como el miR-21, pueden promover la respuesta celular que conduce a la formación y proliferación de la neointima vascular. Así pues, aunque sus vías de actuación pueden ser múltiples y complejas y aún se desconoce el alcance completo de estas regulaciones en el contexto del AAA, sí que parece haber una tendencia al incremento de este miRNA en la zona de la lesión.

Así pues, en resumen, nuestros resultados en tejido corroboran, en gran medida, los resultados anteriores^{203,266,282} y refuerzan la implicación de los miRNAs en la patología aneurismática (Tabla 14).

No obstante, al igual que lo observado en el plasma, en el caso del tejido, algunos resultados difieren entre grupos, poniendo de manifiesto la importancia de continuar con las investigaciones sobre el papel de los miRNAs en la fisiopatología y el desarrollo de los AAA, así como la necesidad de homogeneizar la metodología en sus determinaciones y controles

Tabla 14. Resumen de los estudios más relevantes de expresión de miRNA en tejido de pacientes con AAA. Extraído de Iyer et al³⁰⁰. AAA: aneurisma de aorta abdominal, National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA).

	Año	Casos	Controles	miRNA	Disregulación
K. Kin	2012	AAA grandes (cirugía abierta) n=19	Aorta ascendente en sustitución aórtica n=7	miR-93 miR-155 miR-21 miR-29b miR-27b miR-146a miR-331-3p	Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado
MC. Pahl	2012	AAA grandes (cirugía abierta) <i>Screening</i> n=5 <i>Validación</i> n=36	Biopsias de aorta no aneurismática recogidas en autopsias o del <i>National Disease Research Interchange</i> (NDRI, Philadelphia, PA). <i>Screening</i> n=5 <i>Validación</i> n=7	miR-21 miR-133b miR-146a miR-331-3p	Sobrexpresado Infraexpresado Sobrexpresado Infraexpresado
L. Maegdefessel	2012	AAA grandes en no fumadores (cirugía abierta) n=5 AAA grandes en fumadores (cirugía abierta) n=8 Diámetro aórtico: 57-68 mm	Donantes de órganos sin aneurisma n=5	miR-21	Sobrexpresado

Estudio de miRNAs en la formación de AAA en humanos

	Año	Casos	Controles	miRNA	Disregulación
L. Maegdefessel	2012	AAA grandes (cirugía abierta) n=15 Diámetro aórtico: 59-68 mm	Donantes de órganos sin aneurisma n=5	miR-29b	Infraexpresado
BL. Cheuk	2014	AAA (cirugía abierta) n=6	Donantes de órganos sin aneurisma n=6	Ninguno	Resultados no significativos
E. Biros	2014	Pared de AAA (> 50 mm) <i>Screening</i> n=10 Validación n=6	Cuello de AAA (> 50 mm) <i>Screening</i> n=10 Validación n=6	miR-93 miR-155	Sobrexpresado Sobrexpresado
CW. Kim	2014	Secciones de AAA humanas fijadas en parafina n=5	Secciones de aorta normal fijadas en parafina n=4	miR-21 miR-133b	Sobrexpresado Sobrexpresado
L. Maegdefessel	2014	AAA grandes (cirugía abierta) n=22 Diámetro aórtico: 52-115 mm	Donantes de órganos sin aneurisma n=14	miR-27b	Infraexpresado
PW. Stather	2015	AAA grandes (cirugía abierta) n=19	Donantes de órganos sin aneurisma n=10	Ninguno	Resultados no significativos
R. Spear	2015	AAA (cirugía abierta) n=30	Donantes de órganos sin aneurisma n=14	Ninguno	Resultados no significativos
A. Busch	2016	AAA (cirugía abierta) <i>Screening</i> n=4 Validación n=19	Aorta no aneurismática (no definido) <i>Screening</i> n=4 Validación n=11	miR-21	Infraexpresado

	Año	Casos	Controles	miRNA	Disregulación
N. Araujo	2019	AAA (cirugía abierta) Screening n=6 Validación n=18	Donantes de órganos sin aneurisma n=6	miR-193a-3p miR-125b-5p miR-150-5p (un total de 59 miRs)	Infraexpresado Infraexpresado Sobrexpresado
E. Plana	2020	AAA (cirugía abierta) n=21	Donantes de órganos sin aneurisma n=8	miR-1 miR-27b-3p miR-29b-3p miR-133a-3p miR-133b miR-195-5p miR-146a-5p miR-21-5p miR-144-3p miR-103a-3p	Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Infraexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado Sobrexpresado

7.4 miRNAs in silico

Una de las ventajas que nos aporta los recientes avances en la bioinformática es que nos permite estudiar un grupo de miRNAs en su conjunto, mostrando las rutas en las que pueden participar y sus dianas potenciales, de una manera global. Aplicando un GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*), que es un método de análisis computacional que nos permite estudiar el efecto de un grupo de genes (en este caso de miRNAs) de manera conjunta, hemos explorado *in silico* las posibles dianas de los miRNAs disregulados en las muestras de tejido.

El análisis mediante GSEA recopila la información asignada en las siguientes bases de datos: TargerScan (versión 7.1), miRDB (versión 5.0) e información validada de miRTarBase (versión 7.0). Estas bases de datos compilan información tanto de las dianas validadas de los miRNAs, como de las dianas predichas. Se considera que una diana está validada, si existen estudios previos publicados en los que se ha validado experimentalmente su regulación y/o se ha confirmado que existe una unión real miRNA-mRNA. Se consideran dianas predichas si la unión miRNA-mRNA se ha calculado únicamente de manera teórica en función de la complementariedad de su secuencia y de la energía libre de unión entre las dos moléculas.

Estas aproximaciones bioinformáticas posibilitan, además, estudiar los principales procesos biológicos (BP), funciones moleculares (MF) y componentes celulares (CC) según la clasificación GO (*Gene Ontology*) en las que pueden estar implicadas las moléculas dianas, así como las vías en las que pueden estar participando según la información contenida en KEGG, todo ello de manera integral.

En nuestro estudio, mediante este tipo de análisis, se observó, en primer lugar, que tanto la MEC como la membrana basal, las cuales juegan un papel relevante en el desarrollo de AAA³⁶⁷⁻³⁶⁸, aparecían entre los principales Componentes Celulares relacionados con los miRNAs disregulados. Por otro lado, la cascada de señalización transduccional de las quinasas ERK1/2, la respuesta a estímulos mecánicos y la regulación de los procesos metabólicos de los lípidos, la generación de especies ROS y el metabolismo de los carbohidratos son algunos de los procesos biológicos en los que estos miRNAs podrían estar involucrados. Todos estos procesos están relacionados directa o indirectamente con los AAA³⁶⁹⁻³⁷¹.

Analizando de manera individual cada uno de los genes potencialmente regulados por los miRNAs estudiados, observamos que algunos podrían ser diana de más de un miRNA disregulado en tejido. En particular, el gen *THBS2* podría estar regulado hasta por tres de estos miRNA (miR-144a-3p, miR-21-5p y miR-195-5p).

Este gen codifica la proteína Trombospondina 2, de la familia de las trombospondinas, que es una glicoproteína multifunción liberada por varios tipos de células, incluidos los fibroblastos estromales, las células endoteliales y las células inmunitarias³⁷², y que desempeña un papel importante en las diversas enfermedades cardiovasculares tales como el infarto de miocardio, la hipertrofia cardiaca, la insuficiencia cardiaca y la estenosis valvular aórtica³⁷³. La THBS1 es el miembro más conocido de esta familia, mientras que la THBS2 no ha sido estudiada todavía en profundidad.

Esta proteína media las interacciones célula-célula y célula-MEC y ejerce sus diversos efectos biológicos tales como angiogénesis, motilidad celular, apoptosis y la organización citoesquelética al unirse con proteínas de la MEC y receptores de la superficie celular³⁷⁴⁻³⁷⁶. Además, se cree que modula la adhesión celular de los fibroblastos, regulando la disponibilidad de MMP2 en la MEC³⁷⁷ y es capaz de promover la expresión de MMP13 y la migración celular³⁷⁸. Asimismo, un estudio reciente *in vitro* ha demostrado que THBS2 también induce la proliferación de las CMLV³⁷⁹ y se ha visto que la expresión de esta proteína en suero se correlaciona con la mortalidad cardiovascular en pacientes con AAA³⁸⁰.

El gen *THBS2* ya había sido previamente relacionado con enfermedades cardiovasculares³⁸¹ e incluso un estudio previo relacionaba un polimorfismo en el gen *THBS2* con los aneurismas de aorta torácica³⁸². En cuanto a su relación con los AAA, hasta la fecha, sólo tenemos constancia de un estudio que explora los niveles de THBS2 en humanos³⁸³. Así pues, consideramos una diana candidata para su estudio en tejido de pacientes con AAA.

Además del gen que codifica la trombospondina-2, analizamos cuidadosamente el resto de posibles genes dianas obtenidos a partir del GSEA, y teniendo en cuenta la clasificación del GO, las posibles rutas de actuación y la bibliografía previa, seleccionamos otras 4 proteínas para su cuantificación en tejido: LASP1, ITGAV, LAMB3 y COL11A. LASP1 es una proteína del citoesqueleto que se une a la actina, proteína estructural implicada en la migración celular y la quimiotaxis³⁸⁴. ITGAV pertenece a una familia de proteínas receptoras de la MEC relacionada con la angiogénesis y los AAA¹⁷⁶. LAMB3 es una proteína de la MEC incluida en la familia de las lamininas y cuya relación con los aneurismas de aorta torácica ya ha sido estudiada previamente³⁸⁵. COL11A1 es un colágeno fibrilar menor, estructural y biológicamente relacionado con el colágeno tipo V, eventualmente implicado en la patología aneurismática³⁸⁶.

En nuestro estudio, no fuimos capaces de cuantificar LAMB3 y COL11A1 en muestras de tejido, probablemente debido a los bajos niveles de estas proteínas en pared arterial. Sí que observamos niveles ligeramente superiores, aunque no significativos, de LASP1 e ITGAV en tejido de pacientes con AAA respecto a tejido procedente de donantes de órganos. No hemos encontrado en la bibliografía, ningún otro estudio que correlacione estas proteínas con los AAA, por lo que deberían ser objeto de nuevos estudios.

Por contra, sí observamos niveles significativamente mayores de THBS2 en tejido de pacientes que en controles. Hasta la fecha, únicamente un estudio previo publicado por Didangelos *et al*⁶⁸³ describe también una sobreexpresión de THBS2 en tejido humano de AAA.

En nuestro estudio, además, se ha observado una correlación negativa entre los niveles de THBS2 y los de miR-195-5p, lo que sugiere que THBS2 podría ser una diana real de miR-195-5p y no solo una diana predicha. De hecho, se ha visto que THBS2 y miR-195-5p podrían ejercer un efecto contrario sobre las CMLV, induciendo o inhibiendo su proliferación, respectivamente^{379,387}. Los futuros estudios *in vitro* en cultivos celulares e *in vivo* en modelos animales permitirán analizar de forma controlada nuestros hallazgos preliminares de esta regulación de THBS2 por el miR-195-5p y proporcionarán más información sobre los mecanismos moleculares involucrados.

7.5 Limitaciones del estudio

En primer lugar, una de las limitaciones del estudio realizado en plasma, es la diferencia de edad entre el grupo de pacientes con AAA y los grupos control. A pesar del envejecimiento de la población y del aumento de la calidad de vida, encontrar un buen grupo control para los estudios de enfermedades vasculares es una tarea complicada por la elevada incidencia de otro tipo de patologías y alteraciones que podrían condicionar los resultados.

Para evitar que la edad afectase a nuestros resultados, la diferencia de expresión de los distintos miRNAs circulantes se ha ajustado en un modelo multivariable en el que se ha incluido la edad como variable confusional. Por ello, muchos de los miRNAs aparentemente disregulados en pacientes no resultaron significativos tras el análisis multivariable. Este tipo de ajuste, aunque necesario para evitar la edad y otros factores de riesgo como variables confusionales, puede hacernos descartar algunos miRNAs que podrían estar realmente relacionados con la patología. Además, nuestro estudio se realizó en un conjunto relativamente pequeño de muestras, especialmente en la etapa de cribado, lo que dificulta la realización de un modelo predictivo sólido. Por consiguiente, es necesario ampliar los estudios en poblaciones de mayor tamaño para aumentar la potencia estadística de los resultados, siendo así más robustos.

Por otro lado, nuestro estudio de casos y controles incluye pacientes que ya habían sido diagnosticados de AAA en el momento de la inclusión. Por tanto, no podemos asegurar si la alteración de los miRNA es causa o consecuencia del AAA. Los estudios prospectivos aclararían esta cuestión, sin embargo, requieren el reclutamiento de una gran cantidad de pacientes y un seguimiento a largo plazo.

Por otra parte, una limitación del estudio realizado en muestras de tejido es el bajo número de donantes de tejido sano. Esto se debe, principalmente, a que normalmente la aorta abdominal infrarrenal se extrae junto con los riñones, el explante para donación de órganos más frecuente en España³⁸⁸, por lo que en pocos casos se puede obtener una muestra de aorta infrarrenal adecuada. Estudios colaborativos con otros centros, junto con el auge de los biobancos de investigación como vía de almacenamiento de muestras biológicas permitirán, en un futuro próximo, disponer de un mayor número de muestras accesibles para investigación y con una garantía de trazabilidad.

Por otro lado, los resultados obtenidos de muestras tisulares no pudieron ajustarse en un modelo multivariable y, por tanto, no pudo descartarse ni la edad ni otros factores de riesgo como variables confusionales. Esto se debe a que el tejido control procedía de donantes de órganos y, para garantizar la confidencialidad y el cumplimiento de la ley de protección de datos, estas muestras se almacenan de manera anonimizada en el biobanco y no se pueden obtener los datos clínicos de los donantes estudiados.

Otra de las principales limitaciones del estudio es que las muestras de plasma no corresponden a los mismos pacientes de los que se extrajo la muestra de tejido aórtico, puesto que dichas muestras tisulares pertenecían a una colección previa depositada en el Biobanco de la Fe, de las que no se disponía de plasma pareado. La mayoría de las muestras de plasma pertenecen a pacientes tratados mediante REVA, de los cuales no disponemos de tejido aórtico. Además, los controles empleados en el estudio de tejido pertenecen a donantes de órganos. Este tipo de grupo control no es el apropiado para la obtención de muestras de plasma ya que, en la mayoría de los casos, antes de la extracción de órganos los sujetos se encuentran en circunstancias extremas que podrían alterar las moléculas circulantes, afectando así a los resultados.

Así pues, se requieren estudios adicionales en muestras pareadas de tejido y plasma para corroborar nuestros resultados.

Otros estudios han sugerido previamente diferentes fuentes de tejido como posibles controles^{203,282,288}; sin embargo, su uso también implica varias limitaciones.

Por otra parte, el estudio de la trombospondina como diana del miR-195-5p se ha realizado *in silico* es decir, a través de algoritmos informáticos que explotan la información disponible en diversas bases de datos públicas que basan la posible interacción miRNA-mRNA en la complementariedad de su secuencia.

El hecho de encontrar miRNA y proteína disregulados en tejido y con una correlación negativa, refuerza la idea de que podría tratarse de una diana real y no solo de una diana posible (putativa). Sin embargo, para validar esta relación y confirmar que la trombospondina es una diana real del miR-195-5p sería necesario complementar los estudios de la presente tesis con estudios de expresión *in vitro*, en tejidos celulares y mediante ensayos de unión con luciferasa en los que se podría constatar si existe una unión directa miRNA-mRNA.

7.6 Líneas futuras de investigación

Como hemos comentado, los niveles elevados de THBS2 en tejido de pacientes con AAA, y su correlación negativa con los niveles de su miRNA regulador miR-195-5p sugieren que podría tratarse de una diana real y no sólo putativa de este miRNA. Sin embargo, nuestros hallazgos podrían ser circunstanciales y no permiten establecer causalidad.

Es necesario completar la investigación con estudios *in vitro* de regulación de expresión y de comprobación de unión miRNA-mRNA para poder confirmar la regulación directa miRNA-diana, identificando así nuevas rutas que podrían estar participando en el desarrollo del AAA. Para ello, está prevista la puesta en marcha de nuevos experimentos en los que se transfectarán cultivos celulares con miRNAs sintéticos (mimic y antimiR) del miR-195-5p y se estudiará su efecto en la variación de la expresión de las proteínas diana

Además, se comprobará si se produce una unión verdadera entre miRNA-mRNA, mediante un ensayo con un gen reportero de la luciferasa en el que la unión miRNA-mRNA se traducirá en una disminución de la actividad de ésta.

Aunque el estudio de las proteínas dianas de los miRNAs se ha limitado a 5 por una cuestión eminentemente práctica y económica, sería interesante poder explorar la expresión de otras posibles dianas en tejidos de pacientes con AAA para investigar nuevas rutas involucradas en la patología aneurismática.

Además, el aumento de LASP1 e ITGAV en muestras tisulares, aunque no resultó significativo, abre puertas al estudio más exhaustivo de esas proteínas y su posible implicación en el desarrollo de los AAA.

8 CONCLUSIONES

1. En este estudio, se ha identificado la sobreexpresión de miR-27b-3p y miR-221-2p en el plasma de pacientes con AAA, independientemente de los factores de riesgo cardiovascular clásicos y la edad.

Estos miRNAs se encuentran elevados ligeramente en pacientes con arterosclerosis severa, indicando que podrían ser marcadores de patología degenerativa o aterotrombótica de la pared vascular.

2. miR-144-3p, miR-146a-5p, miR-21-5p y miR-103a-3p han aparecido sobreexpresados, mientras que miR-1, miR-133b, miR-133a-3p, miR-27-b-3p, miR-195-5p y miR-29b-3p se encontraron infraexpresados en el tejido de AAA con respecto al tejido sano. Nuestros resultados en tejido concuerdan con la mayoría de los estudios publicados al respecto.

3. Entre las dianas de los miRNAs disreguladas en tejido, observamos que el *THBS2*, el gen que codifica a la Trombospondina 2 (THBS2), podría estar regulado hasta por 3 de los miRNAs con expresión modificada en este estudio (miR21-5p, miR-195-5p y miR-144-3p).

4. Identificamos una correlación negativa entre logTHBS2 y miR-195-5p. De este modo, THBS2 podría ser diana real de miR-195-5p en la progresión del AAA y ambos podrían estar involucrados en una vía común en el desarrollo de esta patología.

5. En conjunto, los hallazgos de este estudio refuerzan el posible papel de los miRNAs en la fisiopatología de los AAA. Su variabilidad, tanto en muestras plasmáticas como tisulares, limita su utilidad como biomarcadores. Sin embargo, el estudio de sus dianas potenciales permite descubrir vías de disregulación génica y dianas específicas para su eventual identificación, de utilidad diagnóstica, o interferencia, con fines terapéuticos.

9 Fondos y premios recibidos para el desarrollo de la actual tesis

9.1 Fondos:

- Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular (SEACV).

9.2 Premios:

- 65º Congreso Nacional de la SEACV. Mayo 2019, Gran Canaria. Estudio de selección de microRNA como posibles biomarcadores de aneurisma de aorta abdominal. E. Plana, L. Gálvez, P. Medina, S. Navarro, M. Miralles. *Angiología*. Volume 70, Issue 1, January–February 2018, Pages 13-18. (Primer premio al mejor artículo original publicado en la revista *Angiología* el año 2018).
- XXXII Congreso de la Sociedad Española de Arterioesclerosis. Junio 2019, Valencia. Estudio de la expresión de miRNAs y sus dianas en pacientes con aneurisma de aorta abdominal (Premio mención especial 2019).

- 66° Congreso Nacional de la SEACV. Octubre 2020. Estudio de la trombospondina-2 en pacientes con aneurisma de aorta abdominal. (Primer accesit a mejor comunicación).

10 Contribuciones surgidas de esta tesis

10.1 Artículos publicados

- Estudio de selección de microRNA como posibles biomarcadores de aneurisma de aorta abdominal. E. Plana, L. Gálvez, P. Medina, S. Navarro, M. Miralles. *Angiología*. Volume 70, Issue 1, January–February 2018, Pages 13-18.
- Study of microRNA as potential biomarkers of Abdominal Aortic Aneurism. Emma Plana, Laura Gálvez, Pilar Medina, Silvia Navarro, Victoria Fornés-Ferrer, Manuel Miralles. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2019; 58 (6, supplement 1): E191-E-192.
- Identification of novel microRNA profiles dysregulated in plasma and tissue of abdominal aortic aneurysm patients. Emma Plana, Laura Gálvez, Pilar Medina, Silvia Navarro, Victoria Fornés-Ferrer, Joaquín Panadero, Manuel Miralles. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul; 21(13): 4600.

10.2 Presentaciones en congresos

- 7º Symposium de la Sociedad Valenciana de Angiología y Cirugía Vascular. Octubre de 2016, Valencia. Cuantificación de miRNAs circulantes en pacientes con aneurisma de aorta abdominal.
- 63º Congreso Nacional de la SEACV. Junio 2017, Gijón. Cuantificación de miRNAs circulantes en pacientes con aneurisma de aorta abdominal.
- 31st Annual Meeting European Society for Vascular Surgery (ESVS). Septiembre 2017, Lyon. Study of microRNAs as potential biomarkers of abdominal aortic aneurysm.
- 64º Congreso Nacional de la SEACV. Junio 2018, Madrid. Estudio de miRNAs disregulados en tejido de pacientes con aneurisma de aorta abdominal.
- 32nd Annual Meeting European Society for Vascular Surgery (ESVS). Septiembre 2018, Valencia. Study of disregulated miRNAs in abdominal aortic aneurysm tissue.
- XXXII Congreso de la Sociedad Española de Arterioesclerosis. Junio 2019, Valencia. Estudio de la expresión de miRNAs y sus dianas en pacientes con aneurisma de aorta abdominal.

- 33rd Annual Meeting European Society for Vascular Surgery (ESVS). Septiembre 2019, Hamburgo. Quantification of target proteins regulated by miRNAs in abdominal aortic aneurysm tissue.
- LXI Congreso Nacional SEHH y XXXV Congreso Nacional SETH. Octubre de 2019, Valencia. Estudio del papel de los miRNAs y sus dianas en el aneurisma de aorta abdominal.
- 1er Congreso Virtual SEACV. Septiembre 2020. Estudio de la Trombospondina-2 en pacientes con aneurisma de aorta.

11 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Documento Ad Hoc Committee on Reporting Standards of the Society for Vascular Surgery de 1991.
- ² Pearce WH, Slaughter MS, Le Maire S, Salyapongse AN, Feinglass J, McCarthy WJ, *et al.* Aortic diameter as a function of age, gender and body Surface area. *Surgery*. 1993; 114(4): 691-7.
- ³ Wanhainen A, Verzin F, van Herzele I, Allaire E, Brown M, Cohnert T, *et al.* Editor's Choice – European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019. Clinical practice guideline on the management of abdominal aorto-iliac artery aneurysms. *Eur Vasc Endovasc Surg*. 2019; 57(1): 8-93.
- ⁴ 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.
- ⁵ Skov Olsen P, Schroeder T, Agerskov K, Roder O, Sorensen S, Perko M, *et al.* Surgery for abdominal aortic aneurysms. A survey of 656 patients. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1991; 32(5): 636-42.
- ⁶ Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ, Coselli JS, Hess KR, Brooks B, *et al.* Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg*. 1986; 3(3): 389-404.
- ⁷ Safi HJ, Miller CC 3rd. Spinal cord protection in descending thoracic and thoracoabdominal aortic repair. *Ann Thorac Surg*. 1999; 67(6): 1937-9; discussion 1953-8.
- ⁸ Vaquero-Puerta C, San Norberto EM, Brizuela JA, Revilla Á, Estévez I, Fuente R, *et al.* Apuntes de la historia del tratamiento de los aneurismas. *An Real Acad Med Cir Vall*. 2015; 52: 85-99.
- ⁹ Westaby S. Landmarks in cardiac surgery. *Tex Heart Inst J*. 2000; 27(2): 222-3.

- ¹⁰ Saporita A. De tumoribus paeter naturam, (Ravaud, Lyons 1624). Cited by Garrison FH and Morton LT: A medical bibliography; 3rd ed. (Deutsch, London 1970). No. 2971, the manuscip is from 1554.
- ¹¹ de la Garza-Villaseñor JL. Los aneurismas en el tiempo. *Cirujano General*. 2000; 22(3): 264-71.
- ¹² Klaassen Z, Chen J, Dixit V, Tubbs RS, Shoja MM, Loukas M. Giovanni Maria Lancisi (1654-1720): anatomist and papal physician. *Clin Anat*. 2011; 24(7): 802-6.
- ¹³ Livesay JJ, Messner GN, Vaughn WK. Milestones in the treatment of aortic aneurysm: Denton A. Cooley, MD, and the Texas Heart Institute. *Tex Heart Inst J*. 2005; 32(2): 130-4.
- ¹⁴ Trotter MC. Rudolph Matas and the first endoaneurysmorrhaphy: "a fine account of this operation". *J Vasc Surg*. 2010; 51(6): 1569-71.
- ¹⁵ Cooley DA. Aortic surgery: a historical perspective. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2012; 16(1) :7-10.
- ¹⁶ Matas RI. An Operation for the Radical Cure of Aneurism based upon Arteriorrhaphy. *Ann Surg*. 1903; 37(2): 161-96.
- ¹⁷ Singh D. Rudolph Matas (1860-1957): father of vascular surgery. *Indian J Surg*. 2007; 69(6): 270-1.
- ¹⁸ Aida L. Alexis Carrel (1873-1944): visionary vascular surgeon and pioneer in organ transplantation. *J Med Biogr*. 2014; 22(3): 172-5.
- ¹⁹ Cervantes-Castro J. Albert Einstein y su aneurisma de la aorta. *Gac Med Mex*. 2011; 147: 74-6.
- ²⁰ Fortner G, Johansen K. Abdominal aortic aneurysms. *West J Med*. 1984; 140(1): 50-9.
- ²¹ Dubost C, Allary M, Oeconomos N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *AMA Arch Surg*. 1952; 64(3): 405-8.

- ²² DeBaKey ME, Cooley DA, Crawford ES, Morris GC Jr. Clinical application of a new flexible knitted Dacron arterial substitute. 1958. *Am Surg.* 2008; 74(5): 381-6.
- ²³ Levin SM. Breakthrough: Arthur Blakemore and Arthur Voorhees, Jr. *J Vasc Surg.* 2012; 55(6): 1829-31.
- ²⁴ Voorhees AB Jr, Jaretzki A 3rd, Blakemore AH. The use of tubes constructed from vinyon "N" cloth in bridging arterial defects. *Ann Surg.* 1952; 135: 332-6.
- ²⁵ DeBAkey ME, Henly WS, Cooley DA, Morris GC Jr, Crawford ES, Beall AC Jr. Surgical management of dissecting aneurysms of the aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1965; 49: 130-49.
- ²⁶ DeBaKey ME, Cooley DA, Crawford ES, Morris GC Jr. Aneurysms of the thoracic aorta; analysis of 179 patients treated by resection. *J Thorac Surg.* 1958; 36(3): 393-420.
- ²⁷ DeBaKey ME, Crawford ES, Garrett HE, Beall AC Jr, Howell JF. Surgical considerations in the treatment of aneurysms of the thoraco-abdominal aorta. *Ann Surg.* 1965; 162(4): 650-62.
- ²⁸ Crawford ES. Thoraco-Abdominal and abdominal aortic aneurysms involving renal, superior mesenteric, and celiac arteries. *Annals of Surgery.* 1974; 179(5): 763-72.
- ²⁹ Volodos NL. Historical perspective: The first steps in endovascular aortic repair: how it all began. *J Endovasc Ther.* 2013; 20(1): 13-23.
- ³⁰ Volodos NL, Karpovich IP, Troyan VI, Kalashnikova YuV, Shekhanin VE, Ternyuk NE, *et al.* Clinical experience of the use of self-fixing synthetic prostheses for remote endoprosthetics of the thoracic and the abdominal aorta and iliac arteries through the femoral artery and as intraoperative endoprosthesis for aorta reconstruction. *Vasa Suppl.* 1991; 33: 93-5.
- ³¹ Volodos NL, Karpovich IP, Shekhanin VE, Troian VI, Iakovenko LF. A case of distant transfemoral endoprosthesis of the thoracic artery using a self-fixing synthetic prosthesis in traumatic aneurysm. *Grudn Khir.* 1988; (6): 84-6.

- ³² Volodos NL, Shekhanin VE, Karpovich IP, Troian VI, Gur'ev IuA. A self-fixing synthetic blood vessel endoprosthesis. *Vestn Khir Im I I Grek.* 1986; 137(11): 123-5.
- ³³ Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1991; 5(6): 491-9.
- ³⁴ Scott RA, Ashton HA, Kay DN. Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years. *Br J Surg.* 1991; 78: 1122-5.
- ³⁵ Li X, Zhao G, Zhang J, Duan Z, Xin S. Prevalence and trend of the abdominal aortic aneurysms epidemic in general population – A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2013, 8(12): e81260.
- ³⁶ Salvador-González B, Martín-Baranera M, Borque-Ortega Á, Sáez-Sáez RM, de Albert-Delas Vigo M, Carreño-García E, *et al.* Prevalence of Abdominal Aortic Aneurysm in Men Aged 65-74 Years in a Metropolitan Area in North-East Spain. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016; 52(1): 75-81.
- ³⁷ Barba Á, Vega de Céniga M, Estallo L, de la Fuente N, Viviens B, Izagirre M. Prevalence of abdominal aortic aneurysm is still high in certain areas of southern Europe. *Ann Vasc Surg.* 2013; 27(8): 1068-73.
- ³⁸ Salcedo Jódar L, Alcázar Carmona P, Tenías Burillo JM, García Tejada R. Prevalence of abdominal aortic aneurysm in a rural population of 65-80 year old males. *Semergen.* 2014; 40(8): 425-30.
- ³⁹ Svensjö S, Björck M, Gürtelschmid 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.
- ⁴⁰ Jamrozik K, Norman PE, Spencer CA, Parsons RW, Tuohy R, Lawrence-Brown MM, *et al.* Screening for abdominal aortic aneurysm: lessons from a population-based study. *Med J Aust.* 2000; 173(7): 345-50.

- ⁴¹ Lawrence-Brown MM, Norman PE, Jamrozik K, Semmens JB, Donnelly NJ, Spencer C, *et al.* Initial results of ultrasound screening for aneurysm of the abdominal aorta in Western Australia: relevance for endoluminal treatment of aneurysm disease. *Cardiovasc Surg.* 2001; 9(3): 234-40.
- ⁴² Ashton HA, Buxton MJ, Day NE, Kim LG, Marteau TM, Scott RA, *et al.* Multicentre Aneurysm Screening Study Group. 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.
- ⁴³ Davis M, Harris M, Earnshaw JJ. Implementation of the national health service abdominal aortic aneurysm screening program in England. *J Vasc Surg.* 2013; 57(5): 1440-5.
- ⁴⁴ Darwood R, Ernshaw JJ, Turton G, Shaw E, Whyman M, Poskitt K, *et al.* Twenty-year review of abdominal aortic aneurysm screening in men in the county of Gloucestershire, United Kingdom. *J Vasc Surg.* 2012; 56(1): 8-13.
- ⁴⁵ Lindholt JS, Henneberg EW, Fasting H, Juul S. Hospital based screening of 65-73 year old men for abdominal aortic aneurysms in the county of Viborg, Denmark. *J M Screen.* 1996; 3(1): 43-6.
- ⁴⁶ Lindholt JS, Juul S, Fasting H, Henneberg EW. Hospital costs and benefits of screening for abdominal aortic aneurysms. Results from a randomised population screening trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002; 23(1): 55-60.
- ⁴⁷ Cosford PA, Leng GC, Thomas J. Screening for abdominal aortic aneurysm (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 18 (2): CD002945.
- ⁴⁸ Institute for Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Study. <http://www.healthmetricsandevaluation.org/gbd/visualizations/gbd-cause-patterns>.
- ⁴⁹ Howard DPJ, Banerjee A, Fairhead JF, Handa A, Silver LE, Rothwell PM, Oxford Vascular Study. Age-specific incidence, risk factors and outcome of acute abdominal aortic aneurysms in a defined population. *Br J Surg.* 2015; 102(8): 907–15.

⁵⁰ Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM, Le MTQ, Spencer CA, Tuohy RJ *et al.* Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysms. *BMJ.* 2004; 329 (7477): 1259.

⁵¹ Kniemeyer HW, Kessler T, Reber P, Ris HB, Hakki H, Widmer MK. Treatment of ruptured abdominal aortic aneurysm, a permanent challenge or a waste of resources? Prediction of outcome using a multi-organ-dysfunction score. *Eur J Vas. Endovasc Surg.* 2000; 19(2), 190-6.

⁵² Thompson SG, Ashton HA, Gao L, Scott RA. Multicentre Aneurysm Screening Study Group. Screening men for abdominal aortic aneurysm: 10 year mortality and cost effectiveness results from the randomized Multicentre Aneurysm Screening Study. *BMJ* 2009, 338, b2307.

⁵³ Ali MU, Fitzpatrick-Lewis D, Miller J, Warren R, Kenny M, Sherifali D, *et al.* Screening for abdominal aortic aneurysm in asymptomatic adults. *J Vasc Surg.* 2016; 64(6): 1855-68.

⁵⁴ Ying AJ, Affan ET. Abdominal Aortic Aneurysm Screening: A Systematic Review and Meta-analysis of Efficacy and Cost. *Ann Vasc Surg.* 2019; 54: 298-303.

⁵⁵ Kent K, Zwolak R, Egorova N, Riles T, Manganaro A, Moskowitz A, *et al.* Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg.* 2010; 52(3): 539-48.

⁵⁶ Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with others smoking-related disease: A systematic review. *J Vasc Surg.* 2003; 38(2): 329-34.

⁵⁷ 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.

⁵⁸ Altobelli E, Rapacchietta L, Profeta VF, Fagnano R. Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysm in Population-Based Studies: A Systematic

Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(12): 2805.

⁵⁹ Harrison SC, Humphries SE. Regarding "analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals". *J Vasc Surg*. 2011; 53 (1): 263-4.

⁶⁰ Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg*. 2001; 34 (1): 122-6.

⁶¹ Dillavou ED, Muluk SC, Makaroun MS. A decade of change in abdominal aortic aneurysm repair in the United States: have we improved outcomes equally between men and women? *J Vasc Surg* 2006. 43(2): 230-8; discussion 8.

⁶² Vouyouka AG, Kent KC. Arterial vascular disease in women. *J Vasc Surg*. 2007; 46 (6): 1295-302.

⁶³ Powell JT, Greenhalgh RM, Ruckley CV, Fowkes FG. The UK Small Aneurysm Trial. *Ann N Y Acad Sci*, 1996; 800: 249-51.

⁶⁴ Wanhainen A, Lundkvist J, Bergqvist D, Bjorck M. Cost-effectiveness of screening women for abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2006. 43(5): 908-14; discussion 914.

⁶⁵ Aune D, Schlesinger S, Norat T, Riboli E. Tobacco smoking and the risk of abdominal aortic aneurysm: a systematic review and metaanalysis of prospective studies. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 14786.

⁶⁶ 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.

⁶⁷ Wilmink AB, Quick CR. Epidemiology and potential for prevention of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 1998; 85(2): 155-62.

⁶⁸ Kobeissi E, Hibino M, Pan H, Aune D. Blood pressure, hypertension and the risk of abdominal aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol*. 2019; 34(6): 547-55.

- ⁶⁹ Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, *et al.* Aneurysm detection and management veterans affairs cooperative study. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. *Arch Intern Med.* 2000; 160(10): 1425-30.
- ⁷⁰ Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(6): 575-83.
- ⁷¹ Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994–2001. *Circulation.* 2009; 119(16): 2202–8.
- ⁷² Diehm N, Baumgartner I. Determinants of Aneurysmal Aortic Disease. *Circulation.* 2009; 119 (16): 2134-5.
- ⁷³ Baumgartner I, Hirsch AT, Abola MTB, Cacoub PP, Poldermans D, Steg PG *et al.* Cardiovascular risk profile and outcome of patients with abdominal aortic aneurysm in out-patients with atherothrombosis: data from the Reduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry. *J Vasc Surg.* 2008; 48(14): 808-14.
- ⁷⁴ Takagi H. Association of diabetes mellitus with presence, expansion, and rupture of abdominal aortic aneurysm: "Curiouser and curiouser!" cried ALICE. *Semin Vasc Surg.* 2016; 29(1-2): 18-26.
- ⁷⁵ Weiss JS, Sumpio BE. Review of prevalence and outcome of vascular disease in patients with diabetes mellitus. *Eur J Endovasc Vasc Surg.* 2006; 31(2): 143-50.
- ⁷⁶ Vega de Céniga M, Gomez R, Estallo R, Rodriguez L, Baquer M, Barba A. Growth rate and associated factors in small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006; 31(3): 231-36.
- ⁷⁷ Cornuz J, Sidoti Pinto C, Tevaeearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health.* 2004; 14(4): 343-9.

- ⁷⁸ Takagi H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of the association of diabetes with abdominal aortic aneurysm. *Int Angiol.* 2015; 34(4): 375-82.
- ⁷⁹ Miyama N, Dua MM, Yeung JJ, Schultz GM, Asagami T, Sho E, *et al.* Hyperglycemia limits experimental aortic aneurysm progression. *J Vasc Surg.* 2010; 52(4): 975-83.
- ⁸⁰ Belloch García SL. Abdominal aortic aneurysm. Prevalence and associated risk factors in a population of patients hospitalised in Internal Medicine. *Rev Clin Esp (Barc).* 2018; 218(9): 455–60.
- ⁸¹ Laroche JP, Becker F, Baud JM, Miserey G, Jausseant A, Picot MC, *et al.* Ultrasound screening of abdominal aortic aneurysm: Lessons from Vesale 2013. *J Mal Vasc.* 2015; 40(6): 340-9.
- ⁸² Corrado G, Durante A, Genchi V, Trabattoni L, Beretta S, Rovelli E, *et al.* Prevalence of previously undiagnosed abdominal aortic aneurysms in the area of Como: The ComoCuore “looking for AAA” ultrasonography screening. *Int J Cardiovasc Imaging.* 2016; 32(8): 1213-17.
- ⁸³ 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.
- ⁸⁴ Clifton MA. Familiar abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1977; 64(11): 765-6
- ⁸⁵ Tilson MD, Seashore MR. Fifty families with abdominal aortic aneurysms in two or more first order relatives. *Am J Surg.* 1984; 147(4): 551-3
- ⁸⁶ Borkett-Jones HJ, Stewart G, Chilvers AS. Abdominal aortic aneurysms in identical twins. *J R Soc Med.* 1988; 81(8): 471-2.
- ⁸⁷ Adams DCR, Tulloh BR, Galloway SW, Shaw E, Tulloh AJ, Poskitt KR. Familiar abdominal aortic aneurysm: Prevalence and implications for screening. *Eur J Vasc Surg.* 1993; 7(6): 709-12.
- ⁸⁸ 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 7.

⁸⁹ Kitagawa A, Komatsu H, Nagao T. Anatomical Similarity of Abdominal Aortic Aneurysms in Monozygotic Twins. *Ann Vasc Dis.* 2014; 7(2): 187-90.

⁹⁰ Powell JT, Greenhalgh RM. Multifactorial inheritance of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Surg.* 1987; 1(1): 29-31.

⁹¹ Sakalihasan N, Defraigne JO, Kerstenne MA, Cheramy-Bien JP, Smelser DT, Tromp G, *et al.* Family members of patients with abdominal aortic aneurysms are at increased risk for aneurysms: analysis of 618 probands and their families from the Liege AAA Family Study. *Ann Vascular Surg.* 2014; 28(4): 787-97.

⁹² Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association, *Circulation.* 2012; 125(1): e2-e220.

⁹³ Cronenwett, *et al.* Rutherford. *Vascular Surgery.* 8th ed. Philadelphia, Pensilvania. Elsevier, 2014.

⁹⁴ Dilmé Muñoz JF. Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en los niveles locales de factores angiogénicos en el aneurisma de aorta abdominal. Departament de Cirurgia, Universitat Autònoma de Barcelona, 2014.

⁹⁵ Guirguis-Blake JM, Beil TL, Sun X, Senger CA, Whitlock EP. Primary care screening for abdominal aortic aneurysm: a systematic evidence review for the U. S. Preventive Services Task Force. Evidence Syntheses, No. 109. Rockville (MD). Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2014 Jan.

⁹⁶ Brewster DC, Crononwett JL, Hallett JW Jr, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the joint council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2003; 37(5): 1106-17.

- ⁹⁷ Thompson R, Cooper J, Ashton H, Hafez H. Growth rates of small abdominal aortic aneurysms correlate with clinical events. *Br J Surg*. 2020; 97(1): 37-44.
- ⁹⁸ Stonebridge P, Draper T, Kelman J, Howlett J, Allen PL, Prescott R, *et al*. Growth ratio of infrarenal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1996; 11(1): 70-3.
- ⁹⁹ Scott RAP, Tisi PV, Ashton HA, Allen DR. Abdominal aortic aneurysm rupture rates: A 7-year follow-up of the entire abdominal aortic aneurysm population detected by screening. *J Vasc Surg*. 1998; 28(1): 124-8.
- ¹⁰⁰ Vorp DA. Biomechanics of abdominal aortic aneurysm. *Journal of biomechanics*. 2007; 40(9): 1887-902.
- ¹⁰¹ Wilmink T, Quick C, Hubbard C, Day N. The influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1999; 30(2): 203-8.
- ¹⁰² Scott R, Wilson NM, Ashton HA, Kay DN. Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysms: 5 years results of a randomized controlled study. *Br J Surg*. 1995; 82(8): 1066-70.
- ¹⁰³ Multicentre Aneurysm Screening Study Group. Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS): cost effectiveness analysis of screening for abdominal aortic aneurysms based on a four years results from randomized controlled trial. *BMJ*. 2002; 325(7373): 1135-8.
- ¹⁰⁴ Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, *et al*. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 2002; 346(19): 1437-44.
- ¹⁰⁵ The United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants. Long term outcomes of immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med*. 2002; 346(19): 1445-52.

¹⁰⁶ 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.

¹⁰⁷ Samsó JJ, Ros Díe E, Vila Coll R, de Benito Fernández L, Escribano-Ferrer JM, Concejo Alvarez J, *et al.* Guía básica de indicaciones en diagnóstico vascular no invasivo. SEACV.

¹⁰⁸ Arnett DK, Blumenthal RG, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, *et al.* 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2019; 74(10): 1376-414.

¹⁰⁹ Merali FS, Anand SS. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *Vasc Med.* 2002; 7(3): 249-250.

¹¹⁰ Mani K, Wanhainen A, Lundkvist J, Lindström D. Cost-effectiveness of intensive smoking cessation therapy among patients with small abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2011; 54(3): 628-36.

¹¹¹ Slaiby JM, Ricci MA, Gadowski GR, Henley ED, Pilcher DB. Expansion of aortic aneurysms is reduced by propranolol in a hypertensive rat model. *J Vasc Surg.* 1994; 20(2): 178-83.

¹¹² Leach SD, Toole AL, Stern H, DeNatale RW, Tilson MD. Effect of beta adrenergic blockade on the growth rate of abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg.* 1988; 123(5): 606-9.

¹¹³ The Propranolol Aneurysm Trial Investigators. Propranolol for small abdominal aortic aneurysm: Results of a randomized trial. *J Vasc Surg.* 2002; 35(1): 72-9.

¹¹⁴ Baxter T, Pearce W, Waltke E, Littooy F, Hallett J, Kent C, *et al.* Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: Report of a prospective (phase II) multicenter study. *J Vasc Surg.* 2002; 36(1): 1-12.

- ¹¹⁵ Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, *et al.* HMGCoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(11): 1671-8.
- ¹¹⁶ Kalela A, Laaksonen R, Lehtimäki T, Koivu TA, Hoyhtya M, Janatuinen T. Effect of pravastatin in mildly hypercholesterolemic young men on serum matrix metalloproteinases. *Am J Cardiol.* 2001; 88(2): 173-5.
- ¹¹⁷ Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle Chavez SJ, Mao D. Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg.* 2005; 241(1): 92-101.
- ¹¹⁸ Kalyanasundaram A, Elmore JR, Mazaner JR, Golden A, Franklin DP, Galt SW. Simvastatin suppresses experimental aortic aneurysms expansion. *J Vasc Surg.* 2006; 43(1): 117-24.
- ¹¹⁹ Rassmussen HS, McCann PP. Matrix metalloproteinases inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther.* 1997; 75(1): 69-75.
- ¹²⁰ Taraboletti G, Garofalo A, Belotti D. Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(4): 293-8.
- ¹²¹ Bigatel DA, Elmore JR, Carey DJ, Cizmeci G, Franklin DP, Youkey JR. The matrix metalloproteinases BB-94 limits expansion of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999; 29(1): 130-9.
- ¹²² Porter KE, Loftus MI, Peterson M, Bell PR, London NJ, Thomson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg.* 1998; 85(10): 1373-7.
- ¹²³ Claridge MW, Hobbs SD, Quick CR, Day NE, Bradbury AW, Wilmsink AB. ACE inhibitors increase type III collagen synthesis: a potential explanation for reduction in acute vascular events by ACE inhibitors. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28(1): 67-70.

- ¹²⁴ Liao S, Miralles M, Kelley BJ, Curci JA, Borhani M, Thompson RW. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in the rat by treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Vasc Surg.* 2001; 33(5): 1057-64.
- ¹²⁵ Hackam DG, Thiruchelvam D, Redelmeier DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and aortic rupture: a population-based case-control study. *Lancet.* 2006; 368(9536): 659-65.
- ¹²⁶ Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med.* 1993; 328(16): 1167-72.
- ¹²⁷ Ma B, Wang Y-n, Chen K-y, Zhang Y, Pan H, Yang K. Transperitoneal versus retroperitoneal approach for elective open abdominal aortic aneurysm repair. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 2: CD010373.
- ¹²⁸ Darling RC 3er, Shah DM, McClellan WR, Chang BB, Leather RP. Decreased morbidity associated with retroperitoneal exclusion treatment for abdominal aortic aneurysm. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1992; 33(1): 65-9.
- ¹²⁹ Statius van Eps RG, Leurs LJ, Hobo R, Harris PL, Buth J, EUROSTAR Collaborators. Impact of renal dysfunction on operative mortality following endovascular aortic aneurysm surgery. *Br J Surg.* 2007; 94(2): 174-8.
- ¹³⁰ Criado E, Upchurch GR Jr, Young K, Rectenwald JE, Coleman DM, Eliason JL, *et al.* Endovascular aortic aneurysm repair with carbon dioxide-guided angiography in patients with renal insufficiency. *J Vasc Surg.* 2012; 55(6): 1570-5.
- ¹³¹ Lange C, Leurs LJ, Buth J, Myhre HO. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm in octogenarians: an analysis based on EUROSTAR data. *J Vasc Surg.* 2005; 42(4): 624-30; discusión 630.
- ¹³² Beebe HG, Bernhard VM, Parodi JC, White GH. Leaks after endovascular therapy for aneurysm: Detection and classification. *J Endovasc Surgery.* 1996; 3(4): 445-8.

- ¹³³ Powell JT, Sweeting MJ, Ulug P, Blankensteijn JD, Lederle FA, Becquemin JP, *et al.* On behalf of the EVAR-1, DREAM, OVER and ACE Trialists. Meta-analysis of individual-patient data from EVAR-1, DREAM, OVER and ACE trials comparing outcomes of endovascular or open repair for abdominal aortic aneurysm over 5 years. *BJS*. 2017; 104(3): 166–78.
- ¹³⁴ Alothman OY, Bobat S. Comparison of the Short and Long-Term Outcomes of Endovascular Repair and Open Surgical Repair in the Treatment of Unruptured Abdominal Aortic Aneurysms: Meta-Analysis and Systematic Review. *Cureus*. 2020; 12(8): e9683.
- ¹³⁵ Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. *Annu Rev Med*. 2014; 65: 49-62.
- ¹³⁶ Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Rev Esp Cardiol*. 2007; 60(9): 959-67.
- ¹³⁷ Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003; 59(4): 812-23.
- ¹³⁸ Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(12): 786–801.
- ¹³⁹ Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55(4): 639–652.
- ¹⁴⁰ Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1): 55–71.
- ¹⁴¹ Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008; 40(6-7): 1362-78.

- ¹⁴² Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2013; 48(3): 222–272.
- ¹⁴³ Paramo JA, Montero I, Rodríguez JA, Orbe J. Metaloproteasas en aterosclerosis: implicaciones fisiológicas y terapéuticas. *Clin Invest Arterioscl*. 2005; 17(3): 133-41.
- ¹⁴⁴ Galis ZS, Khatir JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 2002; 90(3): 251-62.
- ¹⁴⁵ Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(3): 625-35
- ¹⁴⁶ Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol*. 2006; 17(5): 556-61.
- ¹⁴⁷ Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, *et al*. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*. 2006; 113(16): 1993-2001.
- ¹⁴⁸ Rabkin SW. The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017; 147: 239-65.
- ¹⁴⁹ Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, *et al*. MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *J Exp Med*. 2005; 202(5): 663-71.
- ¹⁵⁰ Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007; 5(2): 265-82.
- ¹⁵¹ Tsai HM. ADAMTS13 and microvascular thrombosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2006; 4(6): 813-25.
- ¹⁵² Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67(1): 92-8.

- ¹⁵³ Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczynska H, Sharma SK, *et al.* Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004; 110(14): 2032-8.
- ¹⁵⁴ Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26(9): 1948-57.
- ¹⁵⁵ Xie Z, Fang T. The expression and significance of NF- κ B, MMP1, and MMP2 in rats with abdominal aortic aneurysm. *Cell Mol Biol*. 2020; 66(3): 17-23.
- ¹⁵⁶ Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000; 20(3): 281-5.
- ¹⁵⁷ Hovsepian DM, Ziporin SJ, Sakurai MK, Lee JK, Curci JA, Thompson RW. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol*. 2000; 11(10): 1345-52.
- ¹⁵⁸ Yao F, Yao Z, Zhong T, Zhang J, Wang T, Zhang B, *et al.* Imatinib prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysm progression by regulating macrophage-derived MMP9. *Eur J Pharmacol*. 2019; 860: 172559.
- ¹⁵⁹ 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.
- ¹⁶⁰ Tieu BC, Lee C, Sun H, Lejeune W, Recinos A 3rd, Ju X, *et al.* An adventitial IL-6/MCP1 amplification loop accelerates macrophage-mediated vascular inflammation leading to aortic dissection in mice. *J Clin Invest*. 2009; 119(12): 3637-51.
- ¹⁶¹ Hans CP, Koenig SN, Huang N, Cheng J, Beceiro S, Guggilam A, *et al.* Inhibition of Notch1 signaling reduces abdominal aortic aneurysm in mice by

attenuating macrophage-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(12): 3012-23.

¹⁶² Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(8): 1746-55.

¹⁶³ Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(8): 1145-51.

¹⁶⁴ Anidjar S, Dobrin PB, Eichorst M, Graham GP, Chejfec G. Correlation of inflammatory infiltrate with the enlargement of experimental aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1992; 16(2): 139-47.

¹⁶⁵ Saraff K, Babamusta F, Cassis LA, Daugherty A. Aortic dissection precedes formation of aneurysms and atherosclerosis in angiotensin II-infused, apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23(9): 1621-6.

¹⁶⁶ Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Cir Res.* 2007; 100(2): 174-190.

¹⁶⁷ Zhang Q, Liu L, Zheng XY. Protective roles of HDL, apoA-I and mimetic peptide on endothelial function: through endothelial cells and endothelial progenitor cells. *Int J Cardiol.* 2009; 133(3): 286-92.

¹⁶⁸ Saito T, Hasegawa Y, Ishigaki Y, Yamada T, Gao J, Imai J, *et al.* Importance of endothelial NF-kappaB signalling in vascular remodelling and aortic aneurysm formation. *Cardiovasc Res.* 2013; 97(1): 106-14.

¹⁶⁹ Ishibashi M, Egashira K, Zhao Q, Hiasa KI, Ohtani K, Ihara Y, *et al.* Bone marrow-derived monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is critical in angiotensin II-induced acceleration of atherosclerosis and aneurysm formation in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(11): 174-8.

- ¹⁷⁰ Mayranpaa MI, Trosien JA, Fontaine V, Folkesson M, Kazi M, Eriksson P, *et al.* Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2009; 50(2): 388-95; discussion 395-6.
- ¹⁷¹ Tsunemi K, Takai S, Nishimoto M, Yuda A, Hasegawa S, Sawada Y, *et al.* Possible roles of angiotensin II-forming enzymes, angiotensin converting enzyme and chymase-like enzyme, in the human aneurysmal aorta. *Hypertens Res.* 2002; 25(6): 817-22.
- ¹⁷² Tsuruda T, Kato J, Hatakeyama K, Kojima K, Yano M, Yano Y, *et al.* Adventitial mast cells contribute to pathogenesis in the progression of abdominal aortic aneurysm. *Cir Res.* 2008; 102(11): 1368-77.
- ¹⁷³ Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, *et al.* Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest.* 2007; 117(11): 3359-68.
- ¹⁷⁴ Shi GP, Lindholt JS. Mast cells in abdominal aortic aneurysms. *Curr Vasc Pharmacol.* 2013; 11(3): 314-26.
- ¹⁷⁵ Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, *et al.* Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 2002; 161(5): 1701-10.
- ¹⁷⁶ 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.
- ¹⁷⁷ Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, *et al.* Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2005; 112(2): 232-40.
- ¹⁷⁸ MacSweeney ST, Powell JT, Greenhalgh RM. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1994; 81(7): 935-41.

- ¹⁷⁹ 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.
- ¹⁸⁰ Galle C, Schandene L, Stordeur P, Peignois Y, Ferreira J, Wautrecht J-C, *et al.* Predominance of type 1 CD4+ T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clinical and experimental immunology.* 2005; 142(3): 519-27.
- ¹⁸¹ 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.
- ¹⁸² Szekanecz Z, Shah MR, Pearce WH, Koch AE. Human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms produce interleukin (IL)-6 and interferon-gamma but not IL-2 and IL-4: the possible role for IL-6 and interferon-gamma in vascular inflammation. *Agents Actions.* 1994; 42(3-4): 159-62.
- ¹⁸³ Maegdefessel L, Spin JM, Adam M, Raaz U, Toh R, Nakagami F, *et al.* Micromanaging abdominal aortic aneurysms. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(7): 14374-94.
- ¹⁸⁴ Lindeman JH, Rabelink TJ, van Bockel JH. Immunosuppression and the abdominal aortic aneurysm: Doctor Jekyll or Mister Hyde? *Circulation.* 2011; 124(18): 463-5.
- ¹⁸⁵ Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjälä H, *et al.* Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11): 2843-7.
- ¹⁸⁶ Lu H, Rateri DL, Bruemmer D, Cassis LA, Daugherty A. Novel mechanisms of abdominal aortic aneurysms. *Curr Atheroscler Rep.* 2012; 14(5): 402-12.
- ¹⁸⁷ 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.

- ¹⁸⁸ Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri P. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995; 91(11): 2703-11.
- ¹⁸⁹ Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53 -dependent and - independent pathways. *Circulation research*. 1995; 77(2): 266-73.
- ¹⁹⁰ Lai CH, Chang CW, Lee FT, Kuo CH, Hsu JH, Liu CP, *et al*. Targeting vascular smooth muscle cell dysfunction with xanthine derivative KMUP-3 inhibits abdominal aortic aneurysm in mice. *Data Brief*. 2020; 30: 105550.
- ¹⁹¹ Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, Tabas I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor-kappaB-mediated inflammation in macrophages. *Cir Res*. 2014; 114 (3): 421-33.
- ¹⁹² 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.
- ¹⁹³ 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 Thrombosis Vasc Biol*. 2002; 22(4): 560-5.
- ¹⁹⁴ 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.
- ¹⁹⁵ 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.
- ¹⁹⁶ Zalba G, Fortuno A, Orbe J, San José G, Moreno MU, Belzunce M, *et al*. Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(3): 587-93.

- ¹⁹⁷ Yan P, Chen K, Wang Q, Yang D, Li D, Yang Y. UCP-2 is involved in angiotensin-II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-knockout mice. *PLoS One* 2017; 12(7): e0179743.
- ¹⁹⁸ Kim HS, Park KG, Koo TB, Huh S, Lee IK. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77(1): S46-8.
- ¹⁹⁹ Hinterseher I, Kuffner H, Berth H, Gäbel G, Bötticher G, Saeger HD, *et al.* Long-term quality of life of abdominal aortic aneurysm patients under surveillance or after operative treatment. *Ann Vasc Surg.* 2013; 27(5): 553-61.
- ²⁰⁰ Kasivisvanathan V, Shalhoub J, Lim CS, Shepherd AC, Thapar A, Davies AH. Hypoxia-inducible factor-1 in arterial disease: a putative therapeutic target. *Curr Vascular Pharmacol.* 2011; 9(3): 333-49.
- ²⁰¹ Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Chung YL, Griffiths J, Wilson RW, *et al.* Hypoxia at the site of abdominal aortic aneurysm rupture is not associated with increased lactate. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085: 306-10.
- ²⁰² Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, *et al.* Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085: 315-9.
- ²⁰³ Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, *et al.* Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc.* 2012; 1(5): e000745.
- ²⁰⁴ Golledge J, Norman PE. Atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm: cause, response, or common risk factors? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30(6): 1075-7.
- ²⁰⁵ Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation*, 2000; 102(10): 1186-91.
- ²⁰⁶ Johnsen SH, Forsdahl SH, Singh K, Jacobsen BK. Atherosclerosis in abdominal aortic aneurysms: a causal event or a process running in parallel? The Tromso study. *Arterioscler Thromb Vascular Biol.* 2010; 30(6): 1263-8.

- ²⁰⁷ Ferguson CD, Clancy P, Bourke B, Walker PJ, Dear A, Buckenham T, *et al.* Association of statin prescription with small abdominal aortic aneurysm progression. *Am Heart J.* 2010; 159(2): 307-13.
- ²⁰⁸ Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thrombosis Vasc Biol.* 2006; 26(5): 987-94.
- ²⁰⁹ Powell JT, Bashir A, Dawson S, Vine N, Henney AM, Humphries SE, *et al.* Genetic variation on chromosome 16 is associated with abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci.* 1990; 78(1): 13-6.
- ²¹⁰ Hirose H, Takagi M, Mayagawa N, Hashiyada H, Noguchi M, Tada S, *et al.* Genetic risk factor for abdominal aortic anerysm: HLA-DR2 (15), a Japanese study. *J Vasc Surg.* 1998; 27(3): 500-3.
- ²¹¹ Rasmussen TE, Hallett JW, Metzger RL, Richardson DM, Harmsen WS, Goronzy JJ, *et al.* Genetic risk factors in inflamatory abdominal aortic aneurysm: Polymorphic residue 70 in the HLA-DR B1 gene as key genetic element. *J Vasc Surg.* 1996; 25(2): 356-64.
- ²¹² Fortuny E, Canadas V, Vilacosta I. Aneurisma aórtico en síndromes hereditarios. Diagnóstico diferencial con el síndrome de Marfan. *Cardiocre.* 2011; 46(3): 105-8.
- ²¹³ Thibord F, Munsch G, Perret C, Suchon P, Roux M, Ibrahim-Kosta M, *et al.* Bayesian network analysis of plasma microRNA sequencing data in patients with venous thrombosis. *Eur Heart J Suppl.* 2020; 22(Suppl C): C34-C45.
- ²¹⁴ Supriya M, Christopher R, Indira Devi B, Bhat DI, Shukla D. Circulating MicroRNAs as Potential Molecular Biomarkers for Intracranial Aneurysmal Rupture. *Mol Diagn Ther.* 2020; 24(3): 351-64.
- ²¹⁵ Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, Kan N, Vasilchenko O, Prozorovskaya K, *et al.* Preeclampsia: The Interplay Between Oxygen-Sensitive miRNAs and Erythropoietin. *J Clin Med.* 2020; 9(2): 574.

- ²¹⁶ Rong J, Xu J, Liu Q, Xu J, Mou T, Zhang X, *et al.* Anti-inflammatory effect of up-regulated microRNA-221-3p on coronary heart disease via suppressing NLRP3/ASC/pro-caspase-1 inflammasome pathway activation. *Cell Cycle*. 2020; 19(12): 1478-91.
- ²¹⁷ Kwak YH, Kwak DK, Kim NY, Kim YJ, Lim JS, Yoo JH. Significant changes in synovial fluid microRNAs after high tibial osteotomy in medial compartmental knee osteoarthritis: Identification of potential prognostic biomarkers. *PLoS One*. 2020; 15(1): e0227596.
- ²¹⁸ Zhou Y, Li S, Chen P, Yang B, Yang J, Liu R, *et al.* MicroRNA-27b-3p inhibits apoptosis of chondrocyte in rheumatoid arthritis by targeting HIPK2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019; 47(1): 1766-71.
- ²¹⁹ Wade SM, McGarry T, Wade SC, Fearon U, Veale DJ. Serum microRNA signature as a diagnostic and therapeutic marker in patients with psoriatic arthritis. *J Rheumatol*. 2020; 47(12): 1760-7.
- ²²⁰ Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, *et al.* miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nat Commun*. 2014; 5: 5214.
- ²²¹ Conserva F, Barozzino M, Pesce F, Divella C, Oranger A, Papale M, *et al.* Urinary miRNA-27b-3p and miRNA-1228-3p correlate with the progression of Kidney Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 11357.
- ²²² Platania CBM, Maisto R, Trotta MC, D'Amico M, Rossi S, Gesualdo C, *et al.* Retinal and circulating miRNA expression patterns in diabetic retinopathy: An in silico and in vivo approach. *Br J Pharmacol*. 2019; 176(13): 2179-2194.
- ²²³ Hromadnikova I, Kotlabova K, Dvorakova L, Krofta L. Diabetes Mellitus and Cardiovascular Risk Assessment in Mothers with a History of Gestational Diabetes Mellitus Based on Postpartal Expression Profile of MicroRNAs Associated with Diabetes Mellitus and Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7): 2437.

- ²²⁴ Castaño C, Kalko S, Novials A, Párrizas M. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115(48): 12158-63.
- ²²⁵ Assmann TS, Riezu-Boj JI, Milagro FI, Martínez JA. Circulating adiposity-related microRNAs as predictors of the response to a low-fat diet in subjects with obesity. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(5): 2956-67.
- ²²⁶ Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008; 455(7209): 58-63.
- ²²⁷ Lee RC <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11679672/> - affiliation-1, Ambros V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis Elegans*. *Science*. 2001; 294(5543): 862-4.
- ²²⁸ Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5): 843-54.
- ²²⁹ Rougvie AE. Control of developmental timing in animals. *Nat Rev Genet* 2001; 2(9): 690-701.
- ²³⁰ Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, *et al*. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408(6808): 86-9.
- ²³¹ Grosshans H, Slack FJ. Micro-RNAs: small is plentiful. *J Cell Biol* 2002; 156(1): 17-21.
- ²³² Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, *et al*. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9(3): 277-9.
- ²³³ Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005; 11(3): 241-7.

- ²³⁴ Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14(10A): 1902-10.
- ²³⁵ Boon RA, Dimmeler S. MicroRNAs and aneurysm formation. *Trends Cardiovasc Med*. 2011; 21(6): 172-7.
- ²³⁶ Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, *et al*. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(8): 2697-706.
- ²³⁷ Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002; 21(17): 4663-70.
- ²³⁸ Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; 10(12): 1957-1966.
- ²³⁹ Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, *et al*. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956): 415-9.
- ²⁴⁰ van Rooij E. The art of microRNA research. *Cir Res*. 2011; 108(2): 219-34.
- ²⁴¹ Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005; 123(4): 631-40.
- ²⁴² Pabón-Martínez YV. MicroARNs: una visión molecular. *Rev Univ Ind Santander Salud*. 2011; 43: 3.
- ²⁴³ Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2): 281-97.
- ²⁴⁴ He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(7): 522-531.
- ²⁴⁵ Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 2009; 15(1): 21-32.

- ²⁴⁶ Meijer HA, Kong YW, Lu WT, Wilczynska A, Spriggs RV, Robinson SW, *et al.* Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science*. 2013; 340(6128): 82-5.
- ²⁴⁷ Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5(6): 463–6.
- ²⁴⁸ Mark Richards A. New Biomarkers in Heart Failure: Applications in Diagnosis, Prognosis, and Guidance of Therapy. *Rev Esp Cardiol*. 2010; 63(6): 635–9.
- ²⁴⁹ Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tuñón J, Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, *et al.* Biomarkers in Cardiovascular Medicine. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(6): 677–88.
- ²⁵⁰ Iqbal N, Alim KS, Aramin H, Iqbal F, Green E, Higginbotham E, *et al.* Novel biomarkers for heart failure. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013; 11(9): 1155-69.
- ²⁵¹ Groeneveld ME, Meekel JP, Rubinstein SM, Merkestein LR, Tangelder GJ, Wisselink W, *et al.* Systematic review of circulating, biomechanical, and genetic markers for the prediction of abdominal aortic aneurysm growth and rupture. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7(13): e007791.
- ²⁵² Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009; 19(1): 92-105.
- ²⁵³ Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002; 12(9): 735-9.
- ²⁵⁴ Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, *et al.* An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(26): 9740-4.
- ²⁵⁵ Tang Y, Liu D, Zhang L, Ingvarsson S, Chen H. Quantitative analysis of miRNA expression in seven human foetal and adult organs. *PLoS One*. 2011; 6(12): e28730.

- ²⁵⁶ Jopling CL, Norman KL, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006; 71: 369-376.
- ²⁵⁷ Bostjancic E, Zidar N, Stajer D, Glavac D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. *Cardiology.* 2010; 115(3): 163-9.
- ²⁵⁸ Healy NA, Heneghan HM, Miller N, Osborne CK, Schiff R, Kerin MJ. Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy. *Int J Cancer.* 2012; 131(10): 2215-22.
- ²⁵⁹ Fiedler J, Thum T. MicroRNAs in Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33(2): 201-5.
- ²⁶⁰ John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004; 2(11): e363.
- ²⁶¹ Shirdel EA, Xie W, Mak TW, Jurisica I. NAViGaTing the micronome-using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One.* 2011; 6(2): e17429.
- ²⁶² Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431(7006): 350-5.
- ²⁶³ Liao M, Zou S, Weng J, Hou L, Yang L, Zhao Z, *et al.* A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis. *J Vasc Surg.* 2011; 53(5): 1341-9.
- ²⁶⁴ Zorio E, Medina P, Rueda J, Millan JM, Arnau MA, Beneyto M, *et al.* Insights into the role of microRNAs in cardiac diseases: from biological signalling to therapeutic targets. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2009; 7(1): 82-90.
- ²⁶⁵ Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Merk DR, Raiesdana A, *et al.* MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. *Sci Transl Med.* 2012; 4(122): 122ra22.

- ²⁶⁶ Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Merk DR, Deng A, Chin JT, *et al.* Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J Clin Invest.* 2012; 122(2): 497-506.
- ²⁶⁷ Kim CW, Kumar S, Son DJ, Jang IH, Griendling KK, Jo H. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(7): 1412-21.
- ²⁶⁸ Liang B, Che J, Zhao H, Zhang Z, Shi G. MiR-195 promotes abdominal aortic aneurysm media remodeling by targeting Smad3. *Cardiovasc. Ther.* 2017; 35.
- ²⁶⁹ van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(48): 18255-60.
- ²⁷⁰ Kwiecinski M, Noetel A, Elfimova N, Trebicka J, Schievenbusch S, Strack I, *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS one.* 2011; 6(9): e24568.
- ²⁷¹ Wang B, Komers R, Carew R, Winbanks CE, Xu B, Herman-Edelstein M, *et al.* Suppression of microRNA-29 expression by TGF-beta1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(2): 252-65.
- ²⁷² Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(6): 1733-43.
- ²⁷³ Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, Hergenreider E, Horrevoets AJ, *et al.* MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ Res.* 2011; 109 (10): 1115-9.
- ²⁷⁴ Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Mariño G, Cadiñanos J, *et al.* Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J.* 2011 ;30(11): 2219-32.

²⁷⁵ Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, *et al.* miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ Res.* 2012; 110(2): 312-24.

²⁷⁶ Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature.* 2009; 460(7256): 705-10.

²⁷⁷ Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, *et al.* The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ.* 2009; 16(12): 1590-8.

²⁷⁸ Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, *et al.* Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest.* 2009; 119(9): 2634-47.

²⁷⁹ Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res.* 2009; 105(2): 158-66.

²⁸⁰ Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 2009; 104(4): 476-87.

²⁸¹ Liu G, Huang Y, Lu X, Lu M, Huang X, Li W, *et al.* Identification and characteristics of microRNAs with altered expression patterns in a rat model of abdominal aortic aneurysms. *Tohoku J Exp Med.* 2010; 222(3): 187-93.

²⁸² Pahl MC, Derr K, Gabel G, Hinterseher I, Elmore JR, Schworer CM, *et al.* MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. *BMC Med Genomics.* 2012; 5: 25.

²⁸³ Jones JA, Stroud RE, O'Quinn EC, Black LE, Barth JL, Eleftheriades JA, *et al.* Selective microRNA suppression in human thoracic aneurysms: relationship of miR-29a to aortic size and proteolytic induction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011; 4(6): 605-13.

- ²⁸⁴ Zhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, *et al.* Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis*. 2011; 215(2): 286-93.
- ²⁸⁵ Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, *et al.* MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest*. 2012; 122(11): 4190-202.
- ²⁸⁶ Donners MMPC, Wolfs IMJ, Stöger LJ, van der Vorst EPC, Pöttgens CCH, Heymans S, *et al.* Hematopoietic miR155 deficiency enhances atherosclerosis and decreases plaque stability in hyperlipidemic Mice. *Plos One*. 2012; 7(4): e35877.
- ²⁸⁷ Biros E, Moran CS, Wang Y, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. microRNA profiling in patients with abdominal aortic aneurysms: the significance of miR-155. *Clin Sci (Lond)*. 2014; 126(11): 795-803.
- ²⁸⁸ Cheuk BL, Cheng SW. Identification and characterization of microRNAs in vascular smooth muscle cells from patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2014; 59(1): 202-9.
- ²⁸⁹ Grasedieck S, Sorrentino A, Langer C, Buske C, Döhner H, Mertens D, *et al.* Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood*. 2013; 121(25): 4977-84.
- ²⁹⁰ Xu J, Zhao J, Evan G, Xiao C, Cheng Y, Xiao J. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(8): 865-75.
- ²⁹¹ Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*. 2005; 438(7068): 685-9.
- ²⁹² Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010; 121(8): 1022-32.
- ²⁹³ Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012; 148(6): 1172-87.

²⁹⁴ Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D, *et al.* Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neutral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther.* 2011; 19(6): 1116-22.

²⁹⁵ Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, *et al.* Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007; 98(2): 427-33.

²⁹⁶ Christopher AF, Kaur RP, Kaur G, Kaur A, Gupta V, Bansal P <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27141472/> - [affiliation-1](#). MicroRNA therapeutics: discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res.* 2016; 8(2): 68-74.

²⁹⁷ Titz-de-Almeida R, David C, Titz-de-Almeida SS. The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market. *Pharm Res.* 2017; 34(7): 1339-63.

²⁹⁸ Bonneau E, Neveu B, Kostantin E, Tsongalis GJ, De Guire V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC.* 2019; 30(2): 114-27.

²⁹⁹ Iyer V, Rowbotham S, Biros E, Bingley J, Golledge J. A systematic review investigating the association of microRNAs with human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 2017; 261: 78-89.

³⁰⁰ <https://www.escardio.org/Guidelines>

³⁰¹ Grupo de Trabajo de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) y la *European Society of Hypertension* (ESH) sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. Guía ESC/ESH 2018 sobre el diagnóstico y tratamiento de la hipertensión arterial. *Rev Esp Cardiol.* 2019; 72(2): 160. e1-e78.

³⁰² <https://www.diabetes.org/diabetes>

³⁰³ Zampetaki A, Attia R, Mayr U, Gomes RS, Phinikaridou A, Yin X, *et al.* Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. *Circ Res.* 2014; 115(10): 857-66.

- ³⁰⁴ Zhang W, Shang T, Huang C, Yu T, Liu C, Qiao Y, *et al.* Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clin. Biochem.* 2015; 48(18): 988-92.
- ³⁰⁵ Busch A, Busch M, Scholz CJ, Kellersmann R, Otto C, Chernogubova E, *et al.* Aneurysm miRNA Signature Differs, Depending on Disease Localization and Morphology. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(1): 81.
- ³⁰⁶ García-García F, Panadero J, Dopazo J, Montaner D. Integrated gene set analysis for microRNA studies. *Bioinformatics.* 2016; 32(18): 2809-16.
- ³⁰⁷ http://www.targetscan.org/vert_71/
- ³⁰⁸ <http://www.mirdb.org/>
- ³⁰⁹ <https://maayanlab.cloud/Harmonizome/resource/MiRTarBase>
- ³¹⁰ <http://geneontology.org/>
- ³¹¹ Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(1): 27-30.
- ³¹² Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 2012.
- ³¹³ Breinam L. Random Forests. *Mach. Learn.* 2001; 45:5-32.
- ³¹⁴ Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome. Res.* 2003; 13(11): 2498-504.
- ³¹⁵ Wang L, Liu Y, Du L, Li J, Jiang X, Zheng G, *et al.* Identification and validation of reference genes for the detection of serum micrnas by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in patients with bladder cancer. *Mol Med Rep.* 2015; 12(1): 615-22.
- ³¹⁶ Zheng G, Wang H, Zhang X, Yang Y, Wang L, Du L, *et al.* Identification and Validation of Reference Genes for qPCR Detection of Serum microRNAs in Colorectal Adenocarcinoma Patients. *PLoS One.* 2013; 8(12): e83025.

- ³¹⁷ Černá V, Ostašov P, Pitule P, Moláček J, Třeška V, Pešta M. The expression profile of microRNAs in small and large abdominal aortic aneurysms. *Cardiol Res Pract.* 2019, 8645840.
- ³¹⁸ Qi YF, Shu C, Xiao ZX, Luo MY, Fang K, Guo YY, *et al.* Post-transcriptional control of tropoelastin in aortic smooth muscle cells affects aortic dissection onset. *Mol Cells.* 2018; 41(3): 198-206.
- ³¹⁹ Lareyre F, Clement M, Moratal C, Loyer X, Jean-Baptiste E, Hassen-Khodja R, *et al.* Differential micro-RNA expression in diabetic patients with abdominal aortic aneurysm. *Biochimie.* 2019; 162: 1-7.
- ³²⁰ Xue L, Luo S, Ding H, Liu Y, Huang W, Fan X, *et al.* Upregulation of miR-146a-5p is associated with increased proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in aortic dissection. *J Clin Lab Anal.* 2019; 33(4): e22843.
- ³²¹ Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, *et al.* MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015; 241(2): 671-81.
- ³²² Han Z, Guan Y, Liu B, Lin Y, Yan Y, Wang H, *et al.* MicroRNA-99a-5p alleviates atherosclerosis via regulating Homeobox A1. *Life Sci.* 2019; 232: 116664.
- ³²³ Ji Z, Chi J, Sun H, Ru A, Ni T, Zhang J, *et al.* Linc-ROR targets FGF2 to regulate HASMC proliferation and migration via sponging miR-195-5p. *Gene.* 2020; 725: 144143.
- ³²⁴ Society for vascular surgery document. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *JVS.* 2018; 67(1): 2–77.
- ³²⁵ Jiang W, Zhang Z, Yang H, Lin Q, Han C, Qin X. The Involvement of miR-29b-3p in Arterial Calcification by Targeting Matrix Metalloproteinase-2. *Biomed Res Int.* 2017: 6713606.

- ³²⁶ Zhao L, Ouyang Y, Bai Y, Gong J, Liao H. miR-155-5p Inhibits the Viability of Vascular Smooth Muscle Cell via Targeting FOS and ZIC3 to Promote Aneurysm Formation. *Eur J Pharmacol.* 2019; 853, 145-52.
- ³²⁷ Ikonomidis JS, Ivey CH, Wheeler JB, Akerman AW, Rice A, Patel RK, *et al.* Plasma Biomarkers for Distinguishing Etiologic Subtypes of Thoracic Aortic Aneurysm Disease. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013; 145(5), 1326-33.
- ³²⁸ Alajbegovic A, Turczyńska KM, Hien TT, Ciudad P, Swärd K, Hellstrand P, *et al.* Regulation of microRNA expression in vascular smooth muscle by MRTF-A and actin polymerization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864(6), 1088-98.
- ³²⁹ Gao S, Wassler M, Zhang L, Li Y, Wang J, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-133a Regulates Insulin-Like Growth factor-1 Receptor Expression and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation in Murine Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014; 232(1), 171-9.
- ³³⁰ Wang C, Tang Y, Wang Y, Li G, Wang L, Li Y, *et al.* Label-free Quantitative proteomics identifies Smarca4 is involved in vascular calcification. *Ren Fail.* 2019, 41(1), 220-8.
- ³³¹ Panizo S. MicroRNAs 29b, 133b, and 211 Regulate Vascular Smooth Muscle Calcification Mediated by High Phosphorus. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27(3), 824-34.
- ³³² Schmidt B, Roessler C, Schumann J. Septic-induced microRNA expression modulations are linked to angiogenesis, vasomotion, and hypoxia-induced processes. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1072: 227-231.
- ³³³ Licholai S, Blaž M, Kapelak B, Sanak M. Unbiased Profile of MicroRNA Expression in Ascending Aortic Aneurysm Tissue Appoints Molecular Pathways Contributing to the Pathology. *Ann Thorac Surg.* 2016; 102(4), 1245-52.
- ³³⁴ Gasiulė S, Stankevičius V, Patamsytė V, Ražanskas R, Žukovas G, Kapustina Z, *et al.* Tissue-Specific miRNAs Regulate the Development of

Thoracic Aortic Aneurysm: The Emerging Role of KLF4 Network. *J Clin Med*. 2019; 8(10): 1609.

³³⁵ Yu X, Jiang D, Wang J, Wang R, Chen T, Wang K, *et al*. Metformin prescription and aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2019; 105(17): 1351-7.

³³⁶ Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, *et al*. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2010; 56(11): 1733-41.

³³⁷ Ramón-Núñez LA, Martos L, Fernández-Pardo Á, Oto J, Medina P, España F, *et al*. Comparison of protocols and RNA carriers for plasma miRNA isolation. Unraveling RNA carrier influence on miRNA isolation. *PLoS One*. 2017; 12(10): e0187005.

³³⁸ Zhou X, Jiao Z, Ji J, Li S, Huang X, Lu X, *et al*. Characterization of mouse serum exosomal small RNA content: The origins and their roles in modulating inflammatory response. *Oncotarget*. 2017; 8(26): 42712-27.

³³⁹ Dolz S, Górriz D, JI Tembl, Sánchez D, Fortea G, Parkhutik V, *et al*. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers of Stenosis Progression in Asymptomatic Carotid Stenosis. *Stroke*. 2017; 48(1): 10-6.

³⁴⁰ Cheng X, Kan P, Ma Z, Wang Y, Song W, Huang C, *et al*. Exploring the potential value of miR-148b-3p, miR-151b and miR-27b-3p as biomarkers in acute ischemic stroke. *Biosci Rep*. 2018; 38(6): BSR20181033.

³⁴¹ Wang X, Sundquist K, Svensson PJ, Rastkhani H, Palmér K, Memon AA, *et al*. Association of recurrent venous thromboembolism and circulating microRNAs. *Clin Epigenetics*. 2019; 11(1): 28.

³⁴² Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 381(1): 81-3.

³⁴³ Zhang X, Shao S, Geng H, Yu Y, Wang C, Liu Z, *et al*. Expression profiles of six circulating microRNAs critical to atherosclerosis in patients with subclinical hypothyroidism: a clinical study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(5): E766-74.

- ³⁴⁴ Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci.* 2012; 19(1): 79.
- ³⁴⁵ Park CS, Kim I, Oh GC, Han JK, Yang HM, Park KW, *et al.* Diagnostic Utility and Pathogenic Role of Circulating MicroRNAs in Vasospastic Angina. *J Clin Med.* 2020; 9(5): E1313.
- ³⁴⁶ Li X, Ballantyne LL, Yu Y, Funk CD. Perivascular adipose tissue-derived extracellular vesicle miR-221-3p mediates vascular remodeling. *FASEB J.* 2019; 33(11): 12704-22.
- ³⁴⁷ Wanhainen A, Mani K, Vorkapic E, De Basso R, Bjorck M, Lanne T, *et al.* Screening of circulating microRNA biomarkers for prevalence of abdominal aortic aneurysm and aneurysm growth. *Atherosclerosis.* 2017; 256: 82–88.
- ³⁴⁸ Pereira-da-Silva T, Coutinho Cruz M, Carrusca C, Cruz Ferreira R, Napoleão P, Mota Carmo M. Circulating microRNA profiles in different arterial territories of stable atherosclerotic disease: a systematic review. *Am J Cardiovasc Dis.* 2018; 8(1): 1-13.
- ³⁴⁹ Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012; 222(2): 314-23.
- ³⁵⁰ Stather PW, Sylvius N, Sidloff DA, Dattani N, Verissimo A, Wild JB, *et al.* Identification of microRNAs associated with abdominal aortic aneurysms and peripheral arterial disease. *Br J Surg.* 2015; 102(7): 755-766.
- ³⁵¹ Ferreira LRP, Frade AF, Santos RHB, Teixeira PC, Baron MA, Navarro IC, *et al.* MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2014; 175(3): 409-17.
- ³⁵² Cheng WL, Kao YH, Chao TF, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. MicroRNA-133 suppresses ZFH3-dependent atrial remodelling and arrhythmia. *Acta Physiol (Oxf).* 2019; 227(3): e13322.
- ³⁵³ Araujo NNF, Lin-Wang HT, Germano JF, Farsky PS, Feldman A, Rossi FH, *et al.* Dysregulation of microRNAs and target genes networks in human abdominal aortic aneurysm tissues. *PLoS One.* 2019; 14(9): e0222782.

- ³⁵⁴ Mataki H, Enokida H, Chiyomaru T, Mizuno K, Matsushita R, Goto Y, Nishikawa R, *et al.* Downregulation of the microRNA-1/133a cluster enhances cancer cell migration and invasion in lung-squamous cell carcinoma via regulation of Coronin1C. *J Hum Genet.* 2015; 60(2): 53-61.
- ³⁵⁵ Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, Waring CD, *et al.* MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ Res.* 2011; 109(8): 880-93.
- ³⁵⁶ Ma X, Yao H, Yang Y, Jin L, Wang Y, Wu L, *et al.* miR-195 suppresses abdominal aortic aneurysm through the TNF- α /NF- κ B and VEGF/PI3K/Akt pathway. *Int J Mol Med.* 2018; 41(4): 2350-8.
- ³⁵⁷ Jiao T, Yao Y, Zhang B, Hao DC, Sun QF, Li JB, *et al.* Role of MicroRNA-103a Targeting ADAM10 in Abdominal Aortic Aneurysm. *Biomed Res Int.* 2017: 9645874.
- ³⁵⁸ Venkatesh P, Phillippi J, Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Velsko I, Gleason T, *et al.* Aneurysm-Specific miR-221 and miR-146a Participates in Human Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(4): 875.
- ³⁵⁹ Zhang C, Wang H, Yang B. miR-146a regulates inflammation and development in patients with abdominal aortic aneurysms by targeting CARD10. *Int Angiol.* 2020; 39(4): 324-2.
- ³⁶⁰ Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, *et al.* MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Mol Med.* 2013; 5(7): 949-66.
- ³⁶¹ Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, *et al.* miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis.* 2011; 219(1): 211-7.
- ³⁶² Saba R, Sorensen DL, Booth SA. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front Immunol.* 2014; 5: 578.
- ³⁶³ Vergadi E, Vaporidi K, Theodorakis EE, Doxaki C, Lagoudaki E, Ieronymaki E, *et al.* Akt2 deficiency protects from acute lung injury via alternative

macrophage activation and miR-146a induction in mice. *J Immunol.* 2014; 192(1): 394-406.

³⁶⁴ Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien S, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci.* 2012; 19(1): 79.

³⁶⁵ Hu YW, Hu YR, Zhao JY, Li SF, Ma X, Wu SG, *et al.* An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94997.

³⁶⁶ Wei Y, Schober A, Weber C. Pathogenic arterial remodeling: the good and bad of microRNAs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013; 304(8): H1050-9.

³⁶⁷ Holsti M, Wanhainen A, Lundin C, Björck M, Tegler G, Svensson J, *et al.* Circulating vascular basement membrane fragments are associated with the diameter of the abdominal aorta and their expression pattern is altered in AAA tissue. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2018; 56(1): 110-8.

³⁶⁸ Kuivaniemi H, Ryer EJ, Elmore JR, Tromp G. Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015; 13(9): 75-987.

³⁶⁹ Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol.* 2018; 175(8): 1279-92.

³⁷⁰ Ghosh A, DiMusto PD, Ehrlichman LK, Sadiq O, McEvoy B, Futchko JS, *et al.* The role of extracellular signal-related kinase during abdominal aortic aneurysm formation. *J Am Coll Surg.* 2012; 215(5): 668-80.

³⁷¹ Qureshi MI, Greco M, Vorkas PA, Holmes E, Davies AH. Application of Metabolic Profiling to Abdominal Aortic Aneurysm Research. *J Proteome Res.* 2017; 16(7): 2325-32.

³⁷² Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36 (6): 961-8.

- ³⁷³ Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Thrombospondins: A Role in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(7): 1540.
- ³⁷⁴ Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(6): 1070-8.
- ³⁷⁵ Risher WC, Eroglu C. Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system. *Matrix Biol.* 2012; 31: 170-7.
- ³⁷⁶ Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3(3-4): 189-200.
- ³⁷⁷ Bornstein P, Armstrong LC, Hankenson KD, Kyriakides TR, Yang Z. Thrombospondin 2, a matricellular protein with diverse functions. *Matrix Biol.* 2000; 19(7): 557-68.
- ³⁷⁸ Liu JF, Lee CW, Tsai MH, Tang CH, Chen PC, Lin LW, *et al.* Thrombospondin 2 promotes tumor metastasis by inducing matrix metalloproteinase-13 production in lung cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2018; 155: 537-46.
- ³⁷⁹ Helkin A, Maier KG, Gahtan V. Thrombospondin-1, -2 and -5 have differential effects on vascular smooth muscle cell physiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015; 464(4): 1022-7.
- ³⁸⁰ Golledge J, Clancy P, Hankey GJ, Norman PE. Relation between serum thrombospondin-2 and cardiovascular mortality in older men screened for abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol.* 2013; 111(12): 1800-4.
- ³⁸¹ Zhao J, Lv T, Quan J, Zhao W, Song J, Li Z, *et al.* Identification of target genes in cardiomyopathy with fibrosis and cardiac remodeling. *J Biomed Sci.* 2018; 25(1): 63.
- ³⁸² Kato K, Oguri M, Kato N, Hibino T, Yajima K, Yoshida T, *et al.* Assessment of genetic risk factors for thoracic aortic aneurysm in hypertensive patients. *Am J Hypertens.* 2008; 21(9): 1023-7.

- ³⁸³ Didangelos A, Yin X, Mandal K, Saje A, Smith A, Xu Q, *et al.* Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10(8): M111.008128.
- ³⁸⁴ Orth MF, Cazes A, Butt E, Grunewald TG. An update on the LIM and SH3 domain protein 1 (LASP1): a versatile structural, signaling, and biomarker protein. *Oncotarget*. 2015; 6(1): 26-42.
- ³⁸⁵ Jones JA, Zavadzkas JA, Chang EI, Sheats N, Koval C, Stroud RE, *et al.* Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 140(3): 653-9.
- ³⁸⁶ Toumpoulis IK, Oxford JT, Cowan DB, Anagnostopoulos CE, Rokkas CK, Chamogeorgakis TP, *et al.* Differential expression of collagen type V and XI alpha-1 in human ascending thoracic aortic aneurysms. *Ann Thorac Surg*. 2009; 88(2): 506-13.
- ³⁸⁷ Wang YS, Wang HY, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, *et al.* MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovasc Res*. 2012; 95(4): 517-26.
- ³⁸⁸ Memorias de actividad de donación y trasplante. ON

12 ANEXOS

12.1 Tampones de electroforesis y tinciones

TBS 10x

Para 1 litro:

- 30 g Tris.
- 80 g NaCL.
- 2 g KCl.
- Hasta 1 litro de H₂O destilada.
- pH 7,4 (ajustar con HCl).

TBST 1x (0'1% Tween-20)

Para 1 litro:

- 1 ml Tween-20.
- 1 litro TBS 1x.

Tris-HCl 1M pH 6,8

Para 500 ml:

- 60 g Tris.
- Hasta 500 ml de H₂O destilada.
- pH 6,8 (ajustar con HCl).

Solución de bloqueo (5% leche en TBST)

Para 100 ml:

- 5 g de leche desnatada en polvo Sveltesse (Nestle®).
- Hasta 100 ml de TBST.

Azul Coomassie para tinción del gel:

Para 1 litro:

- 1 g Coomassie.
- 80 ml ácido acético.
- 460 ml metanol.
- 460 ml H₂O destilada.

Solución de destinción para Azul Coomassie:

Para 1 litro:

- 150 ml ácido acético.
- 200 ml metanol.
- 650 ml H₂O destilada.

Solución de Rojo Ponceau para tinción de membrana

Para 100 ml:

- 1,1 g Rojo Ponceau.
- 1 ml ácido acético.
- Hasta 100 ml H₂O destilada.

12.2 Permisos y autorizaciones



Dr. Manuel Miralles Hernández
Unidad de Angiología y Cirugía Vascolar

Asunto: Autorización Inicio Estudio.

Valencia, 13 de Mayo de 2013

Adjunto le remito copia de los Informes Científico y Ético de Investigación, en el que se acuerda informar **favorablemente**.

A la vista de los dictámenes emitidos, el Proyecto de Investigación titulado: "ESTUDIO DE LOS MICROARNS IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL EN HUMANOS", puede iniciarse y llevarse a cabo.

Atentamente,



Dr. José V. Castell, Ph.D., MD.
Director General



Comisión de Investigación

D. José Vte. Castell Ripoll, Presidente de la Comisión de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia,

INFORMA:

Que el Proyecto de Investigación titulado: "ESTUDIO DE LOS MICROARNs IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL EN HUMANOS" que presenta el/la Dr./Dra. **Manuel Miralles Hernández** de la Unidad de Angiología y Cirugía Vasculardel Hospital La Fe de Valencia, contiene elementos objetivos suficientes en cuanto a la Hipótesis, Planteamientos y Plan de Trabajo que, a juicio de esta Comisión, permiten pronunciarse **positivamente** en cuanto a su viabilidad.

Valencia a 13 de Mayo de 2013.



Comisión de Investigación. Escuela de Enfermería – despacho 619.- Hospital Universitario La Fe.
Avda. Campanar, 21. 46009-Valencia. Spain
Tel.: (+34) 96 1973313; Fax: (+34) 96 3494416. e-mail: cominvest_lafe@gva.es



DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **9 de Abril de 2013**, el Proyecto de Investigación titulado **“ESTUDIO DE LOS MICROARNs IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DEL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL EN HUMANOS.”**, con nº de registro **2013/0068**.

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. MANUEL MIRALLES HERNANDEZ** del servicio de **ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR** como Investigador Principal.

Miembros del CEIB:

Presidente:

Dr. Juan B. Salom Sanvalero. (Unidad de Circulación Cerebral Experimental)

Vicepresidente:

Dr. José Vicente Cervera Zamora. (Hematología)

Secretario:

D. Serafín Rodríguez Capellán. (Asesor jurídico)

Miembros:

Dr. Melchor Hoyos García. (Gerente del Departamento de salud Valencia La Fe)

Dr. José Vicente Castell Ripoll. (Director de Investigación)

Dr. Salvador Aliño Pellicer. (Farmacólogo Clínico - Hospital U. i P. La Fe)

Dra. Remedios Clemente García. (Medicina Intensiva)

Dra. M^º Luisa Martínez Triguero. (Análisis Clínicos)

Dr. José Luis Vicente Sánchez. (Jefe de sección - Unidad de Reanimación)

Dr. Isidro Vitoria Miñana. (Pediatría)

Dra. Belén Beltrán Niciós. (Medicina Digestiva)

Dra. Inmaculada Calvo Penadés. (Reumatología Pediátrica)

Dr. Alfredo José Perales Marin (Jefe de Servicio - Obstetricia)

Dra. Begoña Polo Miquel (Gastroenterología Pediátrica).

Dr. Enrique Viosca Herrero (Jefe de Servicio - Medicina Física y Rehabilitación)

Dra. Eugenia Pareja Ibars (Unidad de Cirugía y Trasplante Hepático).

Dr. Jaime Sanz Caballer (Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)

Dr. José Luis Ponce Marco (Unidad de Cirugía Endocrino Metabólica)



Dr. José Antonio Aznar Lucea (Jefe de Unidad - Hemostasia y Trombosis)
Dra. Pilar Sáenz González (Neonatología)
Dr. Rafael Botella Estrada (Dermatología)
Dr. José Luis Mullor Sanjose (Grupo de Investigación Traslacional en Enfermedades Neurosensoriales)
Dr. Francisco Javier Pemán García (Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
Dra. María José Gómez-Lechón Moliner (Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
Dr. Ramiro Jover Atienza. (Unidad de Bioquímica y Biología Molecular)
Dra. María Tordera Baviera. (Farmacéutica del Hospital)
D. Jesús Delgado Ochando. (Diplomado en Enfermería)

Lo que firmo en Valencia, a 9 de abril de 2013



Fdo.: Don Serafín Rodríguez Capellán
Secretario del Comité Ético de Investigación Biomédica

12.3 Publicaciones

Angiología. 2018;70(1):13–18



Angiología

www.elsevier.es/angiologia



ORIGINAL

Estudio de selección de microRNA como posibles biomarcadores de aneurisma de aorta abdominal



E. Plana^{a,b,*}, L. Gálvez^a, P. Medina^b, S. Navarro^b y M. Miralles^{a,b}

^a Servicio de Angiología y Cirugía Vasculard, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

^b Grupo Acreditado de Investigación en Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vasculard, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, España

Recibido el 4 de septiembre de 2017; aceptado el 5 de septiembre de 2017
Disponible en Internet el 26 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

miR;
Aneurisma;
Biomarcadores

Resumen

Introducción: Los microRNA (miR) son RNA de pequeño tamaño involucrados en la regulación de numerosos procesos biológicos. Debido a su estabilidad y a su capacidad para detectarse en fluidos, se han convertido en objeto de estudio como posibles biomarcadores de diferentes patologías.

Objetivo: Seleccionar un número reducido de miR candidatos a ser biomarcadores de aneurisma de aorta abdominal (AAA).

Material y métodos: Se determinó la expresión de 179 miR en el plasma de 7 pacientes y 7 voluntarios sanos, mediante paneles prediseñados, basados en la tecnología de RT-qPCR.

Resultados: Hemos seleccionado 10 miR disregulados en pacientes como buenos candidatos para su estudio como biomarcadores debido a su implicación en diversos procesos biológicos relacionados con el desarrollo y evolución de AAA.

Conclusiones: Aunque son necesarios estudios adicionales y de validación, algunos de estos miR podrían ser biomarcadores no invasivos de AAA.

© 2017 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

miRs;
Aneurysm;
Biomarkers

Screening of microRNAs as possible biomarkers in abdominal aortic aneurysm

Abstract

Introduction: MicroRNAs (miRs) are small RNA molecules that are involved in several biological processes. Due to their stability and their presence in biological fluids, several studies over the last few years have focused on the use of miRs as biomarkers of different pathologies.

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: plana.emm@gva.es (E. Plana).

P-080 Study of microRNAs as Potential Biomarkers of Abdominal Aortic Aneurysm

Vascular Biology

**Emma Plana Andani ^{1,*}, Laura Gálvez ¹,
Pilar Medina Badenes ², Silvia Navarro Rosales ²,
Victoria Fornés Ferrer ^{3,4}, Manuel Miralles Hernández ¹**

¹ *Angiology and Vascular Surgery Service, Spain*

² *Haemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Vascular Biology Research Group, Spain*

³ *Biostatistics Unit. La Fe Sanitary Research Institute, Valencia, Spain*

⁴ *La Fe University and Polytechnic Hospital, Valencia (Spain), Valencia, Spain*

Introduction - microRNAs (miRs) are small and non-coding RNA molecules that are involved in different biological processes(1). Due to their stability and their presence in biofluids, several investigations have been focused on the use of miRs as biomarkers of different pathologies(2). At this work we tried to identify circulating miRs differentially

Article

Identification of Novel microRNA Profiles Dysregulated in Plasma and Tissue of Abdominal Aortic Aneurysm Patients

Emma Plana ^{1,2,3,*}, Laura Gálvez ¹, Pilar Medina ², Silvia Navarro ², Victoria Fornés-Ferrer ³, Joaquín Panadero ⁴ and Manuel Miralles ^{1,2,5}

¹ Angiology and Vascular Surgery Service, La Fe University and Polytechnic Hospital, 46026 Valencia, Spain; lauragn_124@hotmail.com (L.G.); miralles_manher@gva.es (M.M.)

² Haemostasis, Thrombosis, Arteriosclerosis and Vascular Biology Research Group, Medical Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain; medina_pil@gva.es (P.M.); navarro_silros@gva.es (S.N.)

³ Data Science, Biostatistics Unit, Medical Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain; victoriafornes@hotmail.com

⁴ Genomic-Bioinformatic Unit, Medical Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), 46026 Valencia, Spain; btcpar@gmail.com

⁵ Department of Surgery, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: plana_emm@gva.es; Tel.: +34-961-246-636

Received: 19 May 2020; Accepted: 24 June 2020; Published: 28 June 2020



Abstract: microRNAs (miRNAs) are small RNAs that regulate different biological processes. Our objective was to identify miRNAs dysregulated in plasma and tissue of patients with abdominal aortic aneurysm (AAA) and explore new potential targets involved in AAA. Fifty-seven subjects were recruited for a plasma study (30 AAA patients, 16 healthy volunteers and 11 patients with atherosclerosis). The expression level of 179 miRNAs was screened in plasma from a subset of samples, and dysregulated miRNAs were validated in the entire study population. Dysregulated miRNAs were also quantified in aortic tissue of 21 AAA patients and 8 organ donors. Applying a gene set enrichment analysis, an interaction map of dysregulated miRNAs and their targets was built, and selected targets were quantified in tissue samples. miR-27b-3p and miR-221-3p were overexpressed in plasma of AAA patients compared with healthy controls, 1.6 times and 1.9 times, respectively. In AAA tissue, six miRNAs (miR-1, miR-27b-3p, miR-29b-3p, miR-133a-3p, miR-133b, and miR-195-5p) were underexpressed from 1.6 to 4.8 times and four miRNAs (miR-146a-5p, miR-21-5p, miR-144-3p, and miR-103a-3p) were overexpressed from 1.3 to 7.2 times. Thrombospondin-2, a target of miR-195-5p, was increased in AAA tissue and negatively correlated with the expression of miR-195-5p, suggesting their involvement in a common regulatory mechanism.

Keywords: abdominal aortic aneurysm; microRNAs; miRNAs; biomarkers; Thrombospondin-2; vascular disease

1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a permanent arterial dilatation of over 50% of the normal diameter. The prevalence in the European population ranges from 4.1% to 11.5% [1]. Smoking is one of the main risk factors, together with male sex, age, hypertension (HTN), chronic obstructive pulmonary disease, hyperlipidemia, and family history of the disorder [2]. Several molecular mechanisms, such as proteolytic degradation of aortic wall connective tissue, inflammation, immune response, or biomechanical deterioration of aortic tissue, are involved in AAA pathogenesis [3]. However, those mechanisms are not completely understood and ought to be further

12.4 Premios





LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ARTERIOSCLEROSIS

Y

EL COMITÉ ORGANIZADOR DEL XXXII CONGRESO NACIONAL SEA

Han decidido otorgar por su calidad científica el

PREMIO MENCIÓN ESPECIAL 2019

A la Comunicación Oral presentada

EN EL XXXII CONGRESO NACIONAL S.E.A.

VALENCIA 2019

"Estudio de la expresión de miRNAs y sus dianas en pacientes con Aneurisma de Aorta Abdominal"

Presentada por los autores

Emma Plana, Laura Gálvez, Moisés Falcón, Julia Oto, Pilar Medina, Silvia Navarro,
Joaquín Panadero, Victoria Fornés, Manuel Miralles

1) Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia 2) Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia

Pedro Valdivielso Felices

Presidente SEA

