



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

TESIS DOCTORAL

**Expresión del CD146 en el AAA e identificación de su
forma circulante como biomarcador diagnóstico de la
enfermedad**

Memoria presentada por

Teresa Gallastegi Mozos

Para optar al grado de doctor

Programa de doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad Autónoma de Barcelona

2020



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Angiología, Biología Vasculare Inflamación del IIB-Sant Pau dentro del programa de doctorado en Bioquímica, Biología molecular y Biomedicina del departamento de Bioquímica y Biología molecular de la UAB. La tesis se ha realizado bajo la supervisión y dirección de la Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid y la tutela del Dr. Francisco Blanco Vaca.

Directora:

Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid

Doctoranda:

Teresa Gallastegi Mozos

Barcelona, septiembre 2020

*“Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.” A. Machado*

AGRADECIMIENTOS

La tesis es una montaña rusa con sus subidas y, sobretodo, bajadas. Marie Curie decía que “*Un científico cree en ideas, no en personas*”. Sin embargo, la experiencia me ha demostrado que una consigue finalizar el recorrido gracias también al apoyo y la compañía de la gente que se cruza en el camino y es por ello que quiero dedicar este apartado a todas aquellas personas que me han acompañado durante este proceso.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora de tesis, Dra. Mercedes Camacho Pérez de Madrid. Muchas gracias Mercedes por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en tu laboratorio, por confiar en mí y por guiarme. Sin ti esto no habría sido posible.

Mi agradecimiento a los Servicios de Cirugía Vasculuar y de transplantes de órganos del hospital de Sant Pau por facilitarnos todas las muestras. Este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo sin su colaboración. A la Dra. Matilde Parreño por su ayuda con la purificación de los plásmidos, al Dr. Xavi León por su ayuda con la estadística y a Iris y a Joan de los servicios de IHQ y Microscopía del IIB-Sant Pau.

A los miembros de “la sede del LABVI”; Sonia, mil gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme. Por enseñarme, por tu paciencia, tu compañerismo y tu amistad. Gracias por los consejos sinceros, las mañanas compartidas en cultivos, por ambientarnos el *labo* con tus canciones y por las recomendaciones de libros, pelis y series. Miquel, muchas gracias por tu positivismo desde primera hora de la mañana, por tus consejos, tu comprensión y tus ánimos. Por las recetas y los mejores restaurantes que nos has descubierto. (Aún estamos esperando a que abras el blog, ahí lo dejo...). Habéis sido unos compañeros fantásticos y mara-vi-llo-sos. Gracias por animarme cada vez que salía del cuarto oscuro diciendo “no ha salido” ☹️ y nuestros encuentros fuera de la “sede” de birra y tapas, ¡gracias por todo!

Marta, gràcies per ajudar-me amb els assaigs d’apoptosi, per mantenir-me súper informada durant el procés. Per escolter-me, per tots els consells i per les millors hamburgueses vegetarianas del món mundial! Ha sigut un plaer tenir-te al costat.

A Judith, gracias por enseñarme en los inicios. Por introducirme en el incomprensible mundo del *western blot*, por las risas compartidas en cultivos haciendo cordones y por presentarme al lab 110, donde también he tenido la oportunidad de conocer gente genial. A Laia y a Saray, gracias por contar conmigo para los planes fuera del *labo*, por vuestras visitas divertidas al LABVI y por todos vuestros consejos y ánimos. Gracias también al equipo completo de los mediodías, a los que terminaron su etapa en Sant Pau y a los que siguen: Bea, Ingrid, Carmen, David, Gemma, Javi, Mar, María, Sergi, Silvia, Soumeya... Gracias por las cenas y los amigos invisibles. Y por todos vuestros ánimos durante todos estos años.

Gracias al comité de seguimiento de tesis, al Dr. Ordoñez, Dr. Sánchez Quesada y a la Dra. Galán, por sus consejos y su apoyo para seguir adelante a lo largo del proceso.

A Anna Meseguer y a todos los que en ese momento formaban parte del equipo del laboratorio de Fisiopatología Renal del VHIR, con los que compartí mis inicios en el laboratorio, gracias por cederme una bata, enseñarme a pipetear y a trabajar en el laboratorio. A Eugenia Mato, gracias por darme la oportunidad de seguir aprendiendo para poder llegar hasta aquí. A Olga, gracias por ensañármelo todo cuando empecé en Sant Pau. Por tu sinceridad, tu apoyo, tu cariño y tú amistad. Por preocuparte de que siempre estuviera bien, por alegrarte con todo lo bueno que me pasa y por ser como una hermana mayor para mí, ¡gracias por todo, corasón!

A mi pequeña familia Barcelonesa que ha sido un apoyo indispensable en este proceso. Aida e Irene, mis compañeras de piso, amigas, hermanas... Recuerdo con cierta nostalgia esas infusiones nocturnas, los domingos creativos al son de cantautores, el frío de Ventalló, el *Asia amb gracia*, las cervezas maridadas con plátano frito en Sol y el vino con Sushi... Mil vivencias y las que nos quedan, gracias por ser como sois y por quererme como soy. ¡Qué suerte la mía por haberos cruzado en mi camino! Os quiero mucho.

Marta, graciès per tot! Hemos vivido tantas cosas juntas... Gracias por creer en mí, por estar ahí para animarme y apoyarme en todo. Por tu paciencia y comprensión en mis días malos y tú cariño siempre. Por llevarme a descubrir platos de cualquier parte del mundo, por los bailes de swing y los planes culturales. Por el cóctel de gambas y los vermouths. Mil gracias por ser tan generosa y buena conmigo, ¡Te estimo molt pinpilin!

A mi fiel compañero de cine, Cristian. Gracias por los encuentros con la gran pantalla los días del espectador, por los paseos sin rumbo por la ciudad condal, las cervezas y los vinos, acompañados siempre de unas buenas bravas o hummus y grandes conversaciones. Por tu inmensa empatía, generosidad y sensibilidad. Por ser tan buen amigo y mejor persona.

Diego, el mañico, gran Dr., amante de la cerveza y la literatura. Mil gracias por todos los libros recomendados, por regalarme esas preciosas historias. Por los momentos compartidos y hacerme reír tanto. Por todo tu apoyo y amistad. Por ser un ejemplo de tenacidad y ayudarme a creer en mí.

A Josep, gracias por los buenos momentos compartidos y por enseñarme el idílico lugar donde los Pirineos tocan el cielo.

En definitiva, gracias majos por haber estado ahí, sois lo mejor que me han dado estos años y espero seguir aprendiendo, más si cabe, de vosotros y compartiendo grandes momentos.

En estos momentos me es inevitable acordarme de toda la gente que el destino ha cruzado en mi camino estos años, Blanca, Elia, Eva, Jasmin, Joel, Jone, Sofía, Rita, Víctor, Xavi, Zorione..., a todos, gracias.

Ahora que llega el momento de leer la tesis, me remonto a los años en los que tomé los primeros pasos de este recorrido, a la universidad. Con el sueño de llegar a hacer el doctorado algún día, fui gestando mi curiosidad con mis compañeras de viaje, las Biogirls, Agurtzane, Irati, Itsasne, María y Miriam. Gracias por hacer que recuerde esos años con tanto cariño, porque vernos sea tan cómodo que parezca que no ha pasado el tiempo. Que sigamos recordando anécdotas, sumando momentos, celebrando logros, acompañándonos en los fracasos, riendo y llorando juntas, y que dure, como mínimo, toda la vida.

A Amaia Lasa, desde aquellas primeras jornadas de estudio en 1º de carrera, en las que no faltaban los post-its de colores, hasta las videollamadas durante el confinamiento, pasando por nuestros reencuentros en Donosti, Barcelona, Zaragoza... Mil gracias por haber estado ahí siempre, sin importar la distancia. Por tu bondad, tu amistad sincera y comprensión. Por saber siempre como animarme y ayudarme a creer en mí. Mila esker Xortxi, maitxe zaitxut!

A Belén, Laida y Natalia, las raperas que molan mogollón, con las que viví la primera experiencia de compartir piso. Gracias por vuestra amistad sincera durante todos estos años, ¡y por muchos más!

A los Bydgoszcz-txitos, por nuestra experiencia Polska y por seguir manteniendo esa unión a pesar de la distancia. También habéis sido un gran apoyo estos años, gracias Amaia, Álvaro, Joel, Maitane, Marina y Sara.

Uno nunca se debe de olvidar de donde viene y eso es fácil gracias a ellas. A pesar de la distancia física y el tiempo, siempre han estado ahí y hacen que la vuelta a casa sea grata. Todas ellas cada una a su manera, ejemplares. Mila esker neskak, zuen laguntasunangaitxik eta azkenengo txanpa honetan emandako animo guztiengaitxik, onenak zate: Amaia, Ane, Jurdana, Lide, Maddi, Maitane, Mariñe, Mireia, Miren, Miren, Nekane, Noemi, Olatz, Saioa eta Usoa.

A Cipri, por haberme acompañado desde que no sabía ni hablar hasta hoy. Enseñándome canciones como “la señora del sombrero” y a “coger al toro por los cuernos”. Gracias por aguantarme los días malos y alegrarte por mis logros.

A las familias Gallastegi y Mozos, por su cariño, por ser como son y hacer que me sienta feliz de pertenecer a ellas. A Tía Isa, porque siempre me ha recordado cual era mi vocación cuando lo dudaba, sé que estarás muy orgullosa de que lo haya conseguido.

Aita eta Ama, gracias por darme siempre las mejores oportunidades, por enseñarme a luchar por lo que quiero y apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Por transmitirme el valor de la perseverancia, el pensamiento crítico, la bondad y la entereza. Por vuestro amor incondicional, por celebrar los triunfos y reconfortarme en los momentos más duros. Por confiar en mí y ayudarme a construir la mejor versión de mi misma. Asko maitxe zaitxuztet.

A Marina, mi hermana, mil gracias por ese amor sincero e incondicional. Por decirme las palabras que necesito escuchar para poner los pies en la tierra, aunque a veces no sean plato de buen gusto. Por creer en mí y nunca haber dudado en que puedo lograr lo que me proponga. Por ser un ejemplo para mí de adaptabilidad y flexibilidad y por ser mi compañera siempre, en las buenas y en las malas, maitxe zaitxut, pin!

Mila esker hiruroi honaino heltzen laguntzeagatik eta ni bezain beste momentu hau iristea desiatzeagatik, zuek gabe ez litzateke izango posible!

ABREVIATURAS

α -DG	α -Distroglicano
β -DG	β -Distroglicano
aa	Aminoácidos
AAA	Aneurisma de aorta abdominal
AAT	Aneurisma de aorta torácica
AN	Aorta normal
CAM	Molécula de adhesión celular
CCL20	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 20</i>
CD146	<i>Cluster of differentiation 146</i>
CMM	Célula madre mesenquimal
CMVL	Célula muscular de vasculatura lisa
CSPG	Proteoglicanos de condroitin sulfato
DAG1	Distroglicano-1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HSPG	Proteoglicanos de heparan sulfato
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
LAMA2	subunidad α 2 de la laminina
LAMA3	subunidad α 3 de la laminina
LAMA4	subunidad α 4 de la laminina
LAMA5	Subunidad α 5 de la laminina
MB	Membrana basal
MCAM	<i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1

ME	Matriz extracelular
miRNA	micro ARN
MMP	Metaloproteasa de matriz
NFκB	Factor nuclear kappa B
PBS	Tampón Fosfato
PG	Proteoglicanos
sCD146	CD146 soluble
SFB	Suero Fetal Bovino
SM-MHC	Miosina de cadena pesada del músculo liso
SRF	Factor de respuesta al suero
TAGLN	Transgelina
TIL	Trombo Intraluminal
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante β
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
VEFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una enfermedad vascular caracterizada por una dilatación local de la aorta abdominal superior al 50% del diámetro normal y que afecta al 5-8% de la población masculina mayor de 65 años. Es un proceso degenerativo que puede culminar en la rotura de la pared vascular hecho que se asocia al 75% de mortalidad. No existe ningún tratamiento farmacológico efectivo para limitar su progresión o evitar su rotura siendo la cirugía la única terapia disponible. Es una enfermedad asintomática lo que hace necesario la identificación de biomarcadores circulantes que permitan el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad. Histológicamente se caracteriza por una degeneración de los elementos estructurales de la pared de la aorta y un remodelado de la media de origen multifactorial, con evidencia de inflamación crónica, hipervascularización, destrucción de la lámina elástica y depleción del músculo liso. En este remodelado de la pared vascular asociado al desarrollo del AAA las CMVL juegan un papel fundamental.

El CD146 es una glicoproteína de membrana implicada en la unión de las células vasculares a la MB. Es conocido como receptor de la cadena α -4 de la laminina y correceptor del VEGFR2. Está implicado en procesos como la adhesión, diferenciación, migración y proliferación celular, angiogénesis e inhibición de la apoptosis y su expresión y la de su forma circulante, sCD146, se ha asociado con patologías inflamatorias que presentan daño vascular.

El objetivo principal de esta tesis es comparar la estructura de la pared de la aorta del AAA con la de la AN y estudiar la expresión y actividad del CD146 en el AAA, así como valorar su forma soluble como posible biomarcador diagnóstico de la enfermedad.

Hemos observado que los tejidos de AAA humana presentan alteraciones en la estructura de la pared acompañadas de cambios de los niveles de expresión del ARNm del DAG-1 y de las lamininas de la MB. El ARNm de las cadenas α -2, 3, 4 de la laminina y del DAG-1 se encuentran incrementados en el AAA mientras que la expresión de la cadena α 5 está disminuida.

En muestras de tejido de AAA y AN, hemos demostrado que la expresión del CD146 a nivel de ARNm y proteína disminuye en el tejido patológico debido mayoritariamente a la disminución de su expresión en las CMVL de la capa media. La pérdida de expresión del CD146 en las CMVL se asocia con la disminución de la expresión de las proteínas del fenotipo contráctil de las CMVL, Calponina-1, TAGLN y SM-MHC y el incremento de la expresión del marcador de fenotipo desdiferenciado S100A4.

Utilizando cultivos primarios de CMVL tratados con TGF- β 1 demostramos que la expresión de CD146 se correlaciona con el fenotipo contráctil de las CMVL pero la sobreexpresión de CD146 no regula el fenotipo de las CMVL ni modifica la capacidad de migración y

proliferación de las CMVL en cultivo. Por el contrario, la sobreexpresión de CD146 aumenta la capacidad de adhesión de las células al sustrato y disminuye la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias.

Finalmente, los pacientes con AAA presentan niveles circulantes de sCD146 más bajos que los controles sanos. En los pacientes de AAA los niveles de sCD146 se correlacionan con los niveles de ARNm de CD146 en tejido y se correlacionan negativamente con el diámetro de la aorta. El análisis estadístico indica que los niveles de sCD146 predicen la presencia de AAA con alta especificidad y sensibilidad.

En conjunto, este trabajo demuestra la importancia de la interacción de las CMVL con la MB en el desarrollo del AAA y que en esta enfermedad se produce un cambio fenotípico de las CMVL que pasan del fenotipo contráctil de la aorta sana a un fenotipo sintético o desdiferenciado de la aorta patológica. Por otro lado, propone un biomarcador diagnóstico con posible utilidad clínica para detectar la presencia de AAA desde fases tempranas de la enfermedad.



Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a vascular disease characterized by a focal dilatation of the abdominal aorta larger than 50% of the normal diameter, and affects 5-8% of male over 65 years old. It is a degenerative process and it can culminate in a vascular wall's rupture, which is associated with 75% of death. To date, there is no pharmacological treatment to limit an aneurysm progression or to prevent its rupture, and surgery is the only available therapy. AAA is usually asymptomatic until it ruptures, which emphasizes the need to identify new circulating biomarkers that facilitate the diagnosis and/or the prognosis of the disease.

Histologically, AAAs are characterized by destruction of the structural elements of the aortic wall and remodeling of the media, along with a chronic inflammatory process, hypervascularization, destruction of the elastic lamina and smooth muscle depletion. In this remodeling of the vascular wall related to AAA development, vascular smooth muscle cells (VSMC) play a crucial role.

CD146 is a membrane glycoprotein implicated in the adhesion of vascular cells to the basal membrane (BM). It is known to act as a receptor of the α -4 laminin subunit as well as co-receptor of VEGFR2. Moreover, it is involved in processes such as adhesion, cellular differentiation, migration and proliferation, angiogenesis, and apoptosis inhibition. Besides, CD146 expression and the expression of its circulating form, sCD146, have been associated with inflammatory pathologies that present vascular remodeling.

The aim of the present work is to compare the aortic wall structure of human AAA and NA tissues and to study CD146 expression and activity in the AAA tissue, as well as to analyze its circulating form as a putative diagnostic biomarker of the disease.

We have observed that human AAA tissues present structural alterations in the aortic wall accompanied with changes in BM's DAG-1 and laminin mRNA expression levels. α -2, 3 and 4 subunits of laminins and DAG-1 are overexpressed in AAA, while α -5 subunit is downregulated.

Comparing human AAA and NA tissues, we have also demonstrated that CD146 mRNA and protein expression is downregulated in the pathological tissue, mostly due to the loss of its expression in VSMC from the media layer. Likewise, the loss of CD146 expression in VSMC is associated with downregulation of the VSMC's contractile phenotype's markers Calponina-1, TAGLN and SM-MHC, while it associates with upregulation of the de-differentiated phenotype's marker S100A4.

By using primary culture of VSMCs treated with TGF- β 1, we have demonstrated that CD146 expression correlates with VSMC's contractile phenotype. However, CD146 upregulation does not regulate cell phenotype or cell migration and proliferation capability *in vitro*. Conversely, CD146 upregulation increases cell adhesion to the substrate and decreases pro-inflammatory cytokine's induced cell apoptosis.

Finally, AAA patients present lower circulating sCD146 expression levels than healthy controls. In AAA patients, sCD146 levels positively correlate with CD146 mRNA tissue levels and show an inverse correlation with the diameter of the aorta. Statistical analyses indicate that sCD146 levels predict AAA presence with a high specificity and sensitivity.

Overall, this work demonstrates the importance of VSMC and BM interaction in AAA development and suggests that VSMC modulate their phenotype during the disease process, from a contractile phenotype of the healthy aorta to a de-differentiated or synthetic phenotype of the pathologic aorta. On the other hand, it proposes a diagnostic biomarker with a possible clinical use to detect AAA presence at early stages.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS	17
RESUMEN	21
I. INTRODUCCIÓN	33
1. Estructura de la arteria	35
2. La célula muscular de vasculatura lisa	36
3. La matriz extracelular y la membrana basal	38
4. El aneurisma de aorta abdominal	42
4.1. Fisiopatología del AAA	44
4.2. Factores de riesgo	47
4.3. Biomarcadores	48
4.4. Tratamiento médico	50
4.5. Nuevas dianas terapéuticas del AAA	51
5. El MCAM/CD146	53
5.1. La proteína CD146 y sus isoformas	56
5.2. La expresión de CD146 y sus funciones	57
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	63
III. MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. Obtención de muestras de pacientes: tejido de aorta y plasma	69
2. Cultivo de células musculares vasculares lisas	70
2.1. Obtención del cultivo primario	70
2.2. Mantenimiento de las CMVL	71
2.3. Sobreexpresión proteica en CMVL en cultivo mediante transfección transitoria	72
2.3.1. Transformación de bacterias competentes y obtención del ADN plasmídico	72
2.3.2. Comprobación del ADN plasmídico por gel de agarosa	73
2.3.3. Transfección celular de las CMVL	75
2.4. Inducción del fenotipo contráctil de las CMVL por TGF- β 1	76
3. Estudio de la expresión proteica	76
3.1. Homogenización de tejidos	76

3.2.	Homogenización de células en cultivo	76
3.4.	Electroforesis y Western Blot	77
4.	Estudio de los niveles de ARN mensajero.....	81
4.1.	Extracción de ARN de tejido	81
4.2.	Extracción de ARN celular.....	82
4.3.	Transcripción reversa y PCR a tiempo real	82
5.	Estudio de los niveles de sCD146 en plasma	84
6.	Estudios histológicos del tejido de aorta.....	85
6.1.	Tinciones histológicas específicas	85
6.1.1.	Tinción del ácido periódico.....	85
6.1.2.	Tinción tricómica de Masson (con azul de anilina).....	85
6.2.	Inmunohistoquímica.....	86
6.3.	Inmunofluorescencia.....	87
7.	Ensayos funcionales realizados con las CMVL	89
7.1.	Ensayo de adhesión	89
7.2.	Ensayo de apoptosis	89
7.3.	Ensayo de migración.....	90
7.4.	Ensayo de proliferación	90
7.5.	Comprobación de la inducción del CD146 y de la transfección en las CMVL empleadas en los ensayos funcionales.....	91
8.	Análisis estadístico	91
9.	Determinación del diámetro de la aorta de los pacientes con AAA.....	92
IV.	RESULTADOS	93
1.	Características de los pacientes del estudio.....	95
2.	Estudio histológico de la pared aórtica en AAA y AN.....	97
2.1.	Los tejidos de AAA presentan alteraciones en la estructura de la pared.....	97
2.2.	Los niveles de expresión de ARN mensajero de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas y del receptor DAG-1 están diferencialmente expresados en los tejidos de AAA y AN.....	98
3.	Estudio de la expresión de CD146 en tejidos de AAA y AN.....	101

3.1.	La expresión de CD146 está disminuida en el tejido de AAA, y esta disminución está asociada a la disminución de su expresión en las CMVL de la capa media	101
4.	Caracterización del fenotipo de los cultivos primarios de CMVL.....	103
4.1.	La inducción del fenotipo contráctil por TGF- β 1 se asocia con la inducción de la expresión de CD146 en las CMVL en cultivo	104
5.	Caracterización del fenotipo de las CMVL en el tejido de AAA y AN.....	109
5.1.	Las CMVL del tejido de AAA presentan un fenotipo desdiferenciado o sintético	109
5.2.	La expresión de CD146 en las CMVL de la capa media del tejido de AAA correlaciona con el fenotipo desdiferenciado de las CMVL.....	113
6.	Caracterización del papel del CD146 en el AAA	116
6.1.	La sobreexpresión de CD146 no modifica el fenotipo de las CMVL en cultivo	118
6.2.	La sobreexpresión de CD146 aumenta la capacidad de adhesión de las CMVL en cultivo	119
6.3.	La sobreexpresión de CD146 no modifica la capacidad de migración de las CMVL en cultivo.....	121
6.4.	La sobreexpresión de CD146 no modifica la capacidad de proliferación de las CMVL en cultivo.....	123
6.5.	El CD146 disminuye la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias en las CMVL en cultivo.....	124
7.	Estudio de la expresión de la forma soluble de CD146 (sCD146) en pacientes con AAA y controles sanos (C)	128
7.1.	Los niveles de sCD146 en sangre de los pacientes con AAA están disminuidos	128
7.2.	El sCD146 podría ser un potencial biomarcador del AAA	131
V.	DISCUSIÓN.....	133
VI.	CONCLUSIONES	145
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	149

I. INTRODUCCIÓN

1. Estructura de la arteria

La pared de las arterias está compuesta por 3 capas o tunicas concéntricas: capa interna o túnica íntima, capa o túnica media y capa externa o túnica adventicia (Figura 1). La composición de estas capas varía entre las diferentes arterias, que en función de su tamaño se clasifican en 3 grupos: las arterias grandes o elásticas, las medianas o musculares, y las pequeñas o arteriolas.

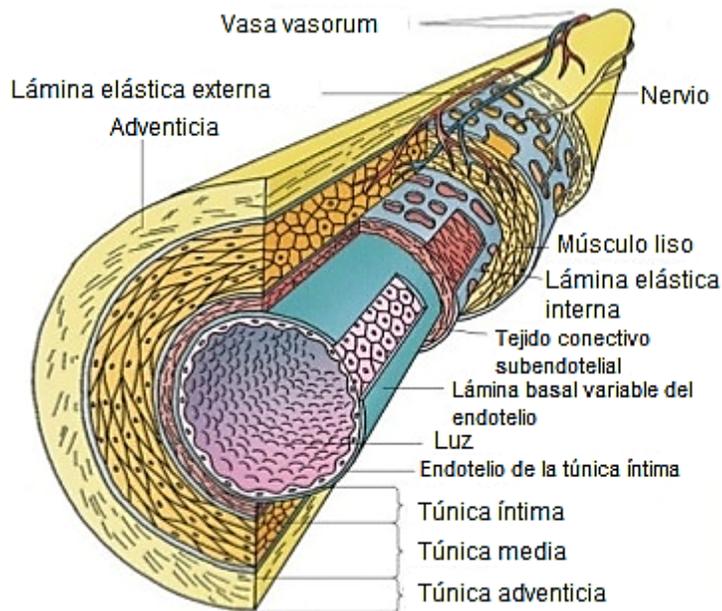
La túnica íntima reviste la superficie interna del vaso y está compuesta por una monocapa de células endoteliales con su lámina/membrana basal (MB), tejido conjuntivo subendotelial y la lámina elástica interna. La capa de tejido conjuntivo subendotelial contiene fibras de colágeno y elásticas, y el tipo de célula principal es la célula muscular de vasculatura lisa (CMVL), aunque ocasionalmente pueden aparecer macrófagos. La íntima constituye una barrera de permeabilidad selectiva entre las células, componentes sanguíneos y el tejido vascular, y ejerce un papel activo en la regulación de la homeostasis vascular.

La túnica media es normalmente la capa más gruesa de las arterias. Está constituida por CMVL dispuestas en forma concéntrica, fibras de colágeno y elásticas en proporción variable según el tipo de arteria, y matriz extracelular (ME). Las CMVL son células contráctiles y son las responsables de la síntesis de las fibras de colágeno, elastina y demás moléculas de la ME. Se distribuyen en capas y están rodeadas de una MB externa. La elastina se encuentra entre las capas de células en forma de láminas fenestradas facilitando la difusión de sustancias dentro de la pared arterial. La lámina elástica externa separa la capa media de la adventicia.

La túnica adventicia es una capa delgada de tejido conjuntivo. Está formada principalmente por ME (con fibras de colágeno y elásticas), fibroblastos y macrófagos. La adventicia sirve de soporte para las terminaciones nerviosas y los *vasa vasorum* (una red finísima de pequeños vasos que se encargan de aportar nutrientes y oxígeno a la pared arterial) y de conexión entre las capas internas de la pared arterial y los tejidos circundantes.

Figura 1. Estructura de la arteria.

Esquema de las tres capas principales de la pared (íntima, media y adventicia) y las láminas elásticas que las separan (lámina elástica externa e interna). Imagen adaptada de Krestan *et al.* (1).



2. La célula muscular de vasculatura lisa

La principal función de las CMVL en los vasos sanguíneos adultos, es la de mantener el tono y ofrecer resistencia al vaso frente a los cambios hemodinámicos. Estas funciones vienen determinadas por los receptores de superficie involucrados en la unión célula-célula y las interacciones entre las células y las proteínas de la ME (2).

Las CMVL presentan propiedades morfológicas y funcionales distintas dentro del mismo vaso sanguíneo así como en diferentes tipos de vasos, por ejemplo, arterias y venas. Poseen una plasticidad que les permite cambios reversibles de fenotipo, lo que se conoce como “modulación fenotípica” o “cambio de fenotipo”. Así, en respuesta a cambios del ambiente extracelular como una lesión vascular o formación de neointima, las CMVL cambian de un fenotipo contráctil o diferenciado a un fenotipo sintético o desdiferenciado (3) (4) (5).

Durante el desarrollo vascular normal, la plasticidad fenotípica de las CMVL es muy importante. Durante dicho proceso, las CMVL presentan una alta tasa de proliferación, migración y síntesis de los componentes de la ME, como colágeno, elastina y proteoglicanos (PG), críticos para la maduración del vaso y el remodelado vascular. Una vez desarrollado por completo el vaso, las CMVL se diferencian a un fenotipo contráctil para asumir las funciones que requiere la pared arterial madura (4).

Sin embargo, esta modulación fenotípica puede resultar perjudicial cuando las CMVL responden a señales ambientales patológicas con un cambio fenotípico hacia un fenotipo sintético, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad vascular (3). De hecho, se ha descrito que las alteraciones del fenotipo de las CMVL juegan un papel clave en la fisiopatología de múltiples enfermedades como la aterosclerosis, restenosis, metástasis tumoral e hipertensión (4) (5).

El fenotipo “contráctil” o diferenciado se caracteriza por una velocidad de proliferación extremadamente baja, una baja actividad sintética y la expresión de un conjunto de proteínas contráctiles, canales iónicos y señalizaciones moleculares que la célula necesita para realizar sus funciones (4).

Algunas proteínas contráctiles y del citoesqueleto, como la proteína α -actina del músculo liso, codificada por el gen *ACTA2*, la Calponina-1, que la codifica el gen *CNN1*, y la transgelina, conocida como TAGLN/SM22 α y codificada por el gen *TAGLN*, participan en la regulación de la contracción del músculo liso. Su expresión transcripcional depende del fenotipo y se conocen como marcadores musculares de las CMVL. También se han empleado como marcadores moleculares del fenotipo las diferentes isoformas de la caldesmona, codificada por el gen *CALD*, la miosina de cadena pesada del músculo liso (SM-MHC), que codifica el gen *MYH11*, la α -tropomyosina, codificada por el gen *TPM1*, y la vinculina/*meta*-vinculina, que codifica el gen *VCL* (3) (6).

El fenotipo sintético se caracteriza con un incremento de la proliferación y de la migración, por la represión de los genes que codifican proteínas contráctiles y, en respuesta a un proceso inflamatorio, por la inducción de la expresión de las MMP. También presenta un cambio de morfología, perdiendo la forma de huso (*splinde shaped morphology*), característica de la célula muscular contráctil, y adquiriendo una morfología romboide (4).

La proteína de unión al calcio S100A4, también conocida como MTS1 y codificada el gen *S100A4*, es una proteína de señalización intracelular de Ca⁺⁺ que puede secretarse (5) (6). Se ha descrito como marcador metastásico que presenta funciones intra y extracelulares y promueve la migración celular (7) (8). Debido a funciones como inhibir la fosforilación de proteínas como la cadena de miosina no muscular (9) e interactuar con proteínas del citoesqueleto, como por ejemplo, la actina (10) puede influir en la motilidad y morfología de las células (7).

La S100A4 se ha identificado como marcador de las CMVL sintéticas en humanos *in vivo* (11). Un estudio demostró que el S100A4, vía extracelular, induce la modulación del fenotipo de la fase contráctil a la fase sintética: cambio de morfología, la disminución de la expresión de

los marcadores musculares y el incremento de la proliferación, migración celular y producción de MMP (7).



Figura 2. Características de los fenotipos de las CMVL, contráctil y sintético. Imagen adaptada de Rzucidlo *et al.* (4).

El mecanismo exacto implicado en la regulación del fenotipo de las CMVL aún está por descubrir. No obstante, mediante modelos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la regulación de la expresión de los genes marcadores musculares del fenotipo contráctil depende de múltiples elementos CC (A/T) 6CG o CARGbox y del factor de respuesta al suero (SRF) (12) (13). También se ha descrito que el factor de transcripción KLF-4 (*Krüppel-like factor-4*) regula la represión de los genes marcadores de diferenciación de las CMVL (14).

Las propiedades de la vasculatura arterial dependen de las CMVL y de su interacción con las proteínas de la ME y de la MB. En condiciones patológicas esta interacción se altera (15) y las CMVL sufren alteraciones en su función contráctil, en la producción de las MMP (16) (17) y en el remodelado de la media (18). De hecho, en pacientes con aterosclerosis se ha observado una represión de los genes *TAGLN*, *ACTA2* y *MYH11* junto a un incremento de la expresión de las MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (5) (19).

Se conoce poco sobre la expresión fenotípica de las CMVL en la lesión aneurismática y su posible papel en la evolución de la enfermedad.

3. La matriz extracelular y la membrana basal

La matriz extracelular (ME) es el conjunto de materiales extracelulares que forman parte de un tejido en el que están "inmersas" las células. Es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio intercelular y que es sintetizado y secretado

por las propias células. Las proteínas que forman parte de la ME son largas y filamentosas, proporcionan resistencia a la tracción y canales para la comunicación y el movimiento de las células del tejido (20).

La ME de las paredes de los vasos está constituida por las membranas basales (MB) y una matriz intersticial fibrilar. Entre las MB se distinguen la MB endotelial, que envuelve los pericitos, y la MB que secretan las CMVL, la cual es independiente y morfológicamente distinguible de la MB endotelial. Subyaciendo a la MB endotelial se encuentra una matriz intersticial fibrilar que interconecta las MB y está compuesta principalmente por colágenos tipo I y III y otras proteínas como elastina, PG (glicoproteínas altamente glicosiladas), fibronectina y lamininas (21).

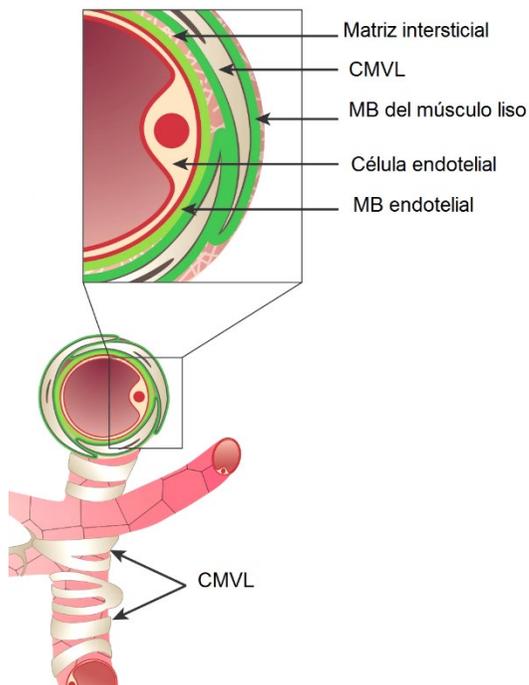


Figura 3. Representación de las membranas basales de un vaso sanguíneo. Se muestra la MB que subyace al endotelio, envolviendo los pericitos, la MB que envuelve a las CMVL, y la matriz intersticial que interconecta las MB. Imagen adaptada de Yousif *et al.* (21).

La MB es una lámina altamente especializada de la ME. Por microscopía electrónica se ha observado que está compuesta por dos capas, la lámina basal y la lámina reticular y su composición molecular varía en función del tejido. Aunque originalmente había sido considerada una estructura de soporte a la cual las células se adhieren, actualmente se sabe que los componentes de la MB regulan actividades biológicas como el crecimiento celular, la diferenciación y migración. De hecho, se sabe que algunas enfermedades genéticas y adquiridas están asociadas a defectos en los componentes de la MB (20).

La MB de los vasos sanguíneos está compuesta mayoritariamente por colágeno IV y lamininas, constituyendo el 50% de las proteínas que la componen. Además, contiene PG de heparan sulfato (HSPG), nidógenos y en menor cantidad otras proteínas como la fibulina, la osteopontina, la agrina, y colágenos del tipo XV y XVIII (20). El autoensamblaje de la MB se conforma con las lamininas como centro de la red. Estas glucoproteínas, a través de otras glucoproteínas, como el perlecano (HSPG) o el nidogeno, se unen al colágeno IV formando una estructura tipo andamio confiriendo estabilidad estructural (22).

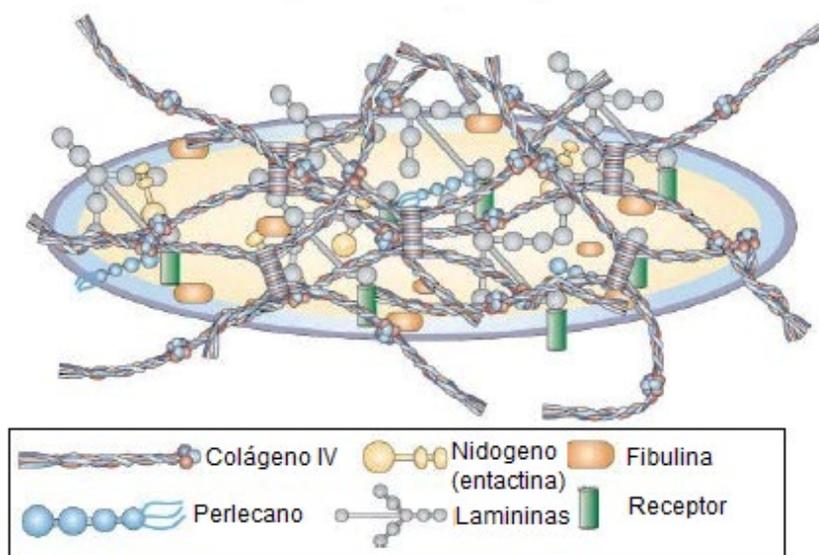


Figura 4. Estructura de la MB y sus componentes. Esquema del andamio que conforman las lamininas y el colágeno IV a través de los puentes creados por el Nidogeno/entactina; y el resto de componentes de la MB que interactúan con la red y se organizan para dar forma a una MB funcional. Imagen adaptada de Kalluri *et al.* (20).

Las lamininas son una familia de proteínas heterotriméricas compuestas de tres cadenas (α , β , γ) de aa altamente glicosiladas y unidas por puentes de disulfuro. Se han identificado cinco cadenas α , cuatro cadenas β y tres cadenas γ , que se combinan y dan lugar a 18 isoformas de lamininas (21). Las diferentes isoformas se denominan de acuerdo con las tres cadenas que la componen, por ejemplo, la laminina 211 está compuesta de las cadenas $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ (23). Las lamininas son las responsables de las funciones biológicas de la MB ya que, a través de su interacción con receptores de membrana de la superficie celular (15) (21), participan

en la adhesión y migración celular y regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (24).

El dominio N-terminal de la cadena de las lamininas participa en el autoensamblaje para formar la red de la MB, mientras que los sitios de unión a los receptores se encuentran en los dominios C-terminal, formados únicamente por secuencias de la cadena α lo que hace que sean estas cadenas las importantes en la transducción de señales específicas vía receptor (21).

En las células endoteliales vasculares se ha descrito la expresión de las cadenas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la laminina que se combinan con las cadenas $\beta 1$ y $\gamma 1$ formando las lamininas 411 y 511 respectivamente (21). La laminina 411 también se ha identificado en la membrana basal endotelial vascular bajo condiciones inflamatorias y homeostáticas (25). Asimismo, en células endoteliales en cultivo, el TNF- α induce la expresión de la cadena $\alpha 4$ y la progesterona y los factores angiostáticos la $\alpha 5$, lo que indica distinta funcionalidad de ambas lamininas (26).

En el músculo liso de los grandes vasos como la aorta en cambio, se ha descrito que las CMVL expresan las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ y las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$, lo que sugiere la presencia de las lamininas 211, 411, 511, 221, 421 y 521 (27). No obstante, en comparación con el endotelio, el conocimiento de las lamininas de la MB de las CMVL es escaso, tanto en condiciones normales como en patológicas (15).

Entre los receptores que se unen a las cadenas $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de las lamininas se han descrito las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$, la molécula de adhesión celular basal del grupo sanguíneo Lutheran (Lu/BCAM) y el α -dístroglicano (21).

Las integrinas son mecanosensores transmembranales que transmiten señales de la ME al citoesqueleto y/o activan vías de señalización que regulan la forma, adhesión, diferenciación, proliferación y contracción celular (28). Asimismo, son críticas para la regulación de las vías de señalización que determinan el fenotipo de las CMVL (21).

El receptor mayoritario de las lamininas en las CMVL es la integrina $\alpha 7\beta 1$ cuya expresión se incrementa durante la diferenciación y a través de su interacción con las lamininas favorece el fenotipo contráctil de las CMVL. De hecho, en ratones adultos, la pérdida de la integrina $\alpha 7$ da lugar a hiperplasia (29). Asimismo, las lamininas 411 y 421, que se expresan en vasos sanguíneos, linfáticos y en algunas células tumorales, promueven la migración tumoral vía integrina $\alpha 6\beta 1$ y CD146 (24).

El Dístroglicano, codificado por el gen *DAG-1*, constituye el nexo de unión entre el citoesqueleto de la célula y la matriz extracelular. Es una glicoproteína clave del complejo

Distrofina-glicoproteína (DGC). El DGC está conformado por un grupo de proteínas membranales, periféricas e integrales que proporcionan un vínculo estructural entre la ME y el citoesqueleto de las células musculares.

Durante la modificación postraduccional, por proteólisis, el DAG-1 se parte por la Ser 654 formando α -dístroglicano (α -DG) y β -dístroglicano (β -DG). La glicoproteína de membrana β -DG se une con la distrofina, proteína citoesquelética, y extracelularmente con el α -DG que a su vez, se une a la cadena $\alpha 2$ de la laminina. Así, la distrofina participa en la interacción de la ME con el citoesqueleto de actina, mientras que las subunidades del dístroglicano participan en las vías de señalización al interactuar con las proteínas de señalización (30). El α -DG también se conoce como receptor de la laminina 511 (21).

Las mecanorrespuestas del músculo liso vascular requieren de una conexión entre las CMVL y su MB (15). Actualmente no existen estudios *in vivo* acerca de la distribución y la expresión de los componentes de la MB en los vasos que sufren remodelado, ni de cómo estos cambios impactan en las funciones del músculo liso. Sin embargo, algunos estudios demuestran que las lamininas promueven el fenotipo contráctil al inducir la expresión de las proteínas contráctiles de las CMVL, *in vitro* e *in vivo* (31).

Entender las diferencias entre la composición y la estructura de las MB de distintos órganos podría revelar como el microambiente celular influye en la funcionalidad de los tejidos (21). De hecho, en pacientes con aneurisma de aorta torácica se ha observado que la MB sufre importantes alteraciones estructurales (32), pero aún es muy poco conocido el papel de la estructura y la actividad de la MB en el AAA.

4. El aneurisma de aorta abdominal

Un aneurisma es una dilatación progresiva, permanente y localizada de una arteria. Es una patología vascular degenerativa que afecta a las arterias y la más frecuente es en la aorta abdominal infrarrenal (33).

La aorta es la principal arteria del cuerpo humano, responsable de transportar y distribuir la sangre rica en oxígeno del corazón al resto del organismo. Da lugar a todas las arterias del sistema circulatorio, excepto las arterias pulmonares, y se divide en los componentes torácico y abdominal. La aorta torácica se clasifica en la aorta ascendente, el arco aórtico y la aorta torácica descendente, mientras que la aorta abdominal comprende el recorrido desde el diafragma hasta la bifurcación en las ilíacas. Los aneurismas se pueden desarrollar

en la aorta torácica (AAT) o en la aorta abdominal (AAA) (34) (35), concretamente en la zona infrarrenal, que debido a su localización se expone a fuerzas hemodinámicas únicas que la predisponen a la dilatación vascular (36).

El aneurisma se define como una dilatación superior al 50% del diámetro normal del vaso, por lo que, a nivel de la aorta abdominal, sería un tamaño del diámetro igual o superior a 3 cm (37). Es un proceso progresivo que alterna fases de aceleración con periodos de estabilidad, y puede culminar en la rotura de la pared vascular que se asocia al 75% de mortalidad (33). De hecho, el AAA se encuentra entre las principales causas de muerte a partir de la sexta década de vida (38).

La incidencia del AAA es mayor en hombres que en mujeres, con una ratio 6:1, e implica una afectación del 5-8% de la población masculina mayor de 65 años (37). Además, el riesgo de muerte por rotura, a partir de esta edad, incrementa un 40% cada 5 años (39). La incidencia media anual de nuevos casos es de 0.4-0.67% en las poblaciones de los países occidentales (40) (41) (42), y la incidencia de muerte por rotura está aumentando, suponiendo ya el 1-2% del total de fallecimientos (43) (44) aunque las cifras podrían estar infravaloradas ya que sólo reflejan los casos en los que se realiza el examen *postmortem* (33) (37). Este incremento podría asociarse al aumento de esperanza de vida poblacional.

La mayoría de los AAA son asintomáticos, sólo entre el 5 y el 22% de los pacientes presentan síntomas como dolor abdominal, dolor lumbar o eventos embólicos (45). Ante este escenario, el diagnóstico de esta patología resulta problemática (37), ya que, generalmente, se identifica accidentalmente tras una prueba de imagen realizada por una patología concomitante del paciente. Los programas de *screening* por ultrasonidos han mostrado una reducción de la mortalidad por AAA entre los hombres de 65-79 años, pero en las mujeres, debido a la baja prevalencia, estos programas no son coste-efectivos (46) (47) (48) (49).

Actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo para el aneurisma capaz de limitar su progresión o evitar su rotura. Cuando el diámetro se mantiene entre los 3-5 cm, el manejo de los AAA se basa en un seguimiento periódico donde se realizan pruebas de imagen, control de los factores de riesgo cardiovascular y un tratamiento médico con terapia antiagregante y estatinas. La única terapia aplicable es la cirugía, que puede ser endovascular o abierta. La reparación quirúrgica se aplica cuando el riesgo de rotura supera el riesgo de la intervención y en general, a mayor tamaño mayor riesgo de rotura. Cuando el diámetro de la aorta supera los 5.5 cm de diámetro transversal máximo o bien crece más de 0,5 cm en un periodo de 6 meses, el tratamiento es necesario. Se ha demostrado que la presencia de síntomas está asociada con el incremento del riesgo de rotura y por lo tanto también es causa de cirugía (33).

Hoy día, la cirugía endovascular resulta la mejor opción, en los casos en los que anatómicamente es posible, ya que cuenta con una mejor supervivencia perioperatoria (33) (50) (51).

En resumen, el tratamiento dependerá del diámetro aórtico, la tasa de crecimiento y el potencial riesgo quirúrgico del paciente (33).

4.1. Fisiopatología del AAA

La fisiopatología del AAA es un proceso multifactorial complejo. Histológicamente el AAA se caracteriza por una degeneración de los elementos estructurales de la pared de la aorta y un remodelado de la media de origen multifactorial, con evidencia de inflamación crónica, hipervascularización, destrucción de la lámina elástica y depleción del músculo liso. Además de los factores genéticos y la inflamación, los factores biomecánicos también influyen en la progresión y rotura de los AAA (52).

Esta patología comienza cuando un evento desconocido produce una lesión en la pared de la aorta y se produce el reclutamiento de leucocitos que liberan citoquinas proinflamatorias. En respuesta a la producción de estas citoquinas los macrófagos y las CMVL liberan proteasas como metaloproteasas (MMP) (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, MMP-19) (53) (54) produciéndose así la degradación de las proteínas de la ME, de las fibras de colágeno y elastina (52) (Figura 5). Se ha demostrado que la expresión de las MMP se encuentra incrementada en los tejidos aneurismáticos (55) (56). Posteriormente, las CMVL sufren apoptosis perdiéndose de este modo las células mayoritariamente responsables de la síntesis de las proteínas de la ME.

La proteólisis de la ME está liderada por las MMP pero otras proteasas como la plasmina, las serinelastasas y las catepsinas, unido a la reducción de la expresión de proteínas elastogénicas como la Fibulina (57), también favorecen este proceso. La actividad de las proteasas produce la degradación de la matriz y provoca la pérdida de la estructura laminar y de las propiedades elásticas de la media, convirtiéndose así en uno de los procesos clave del desarrollo de la patología.

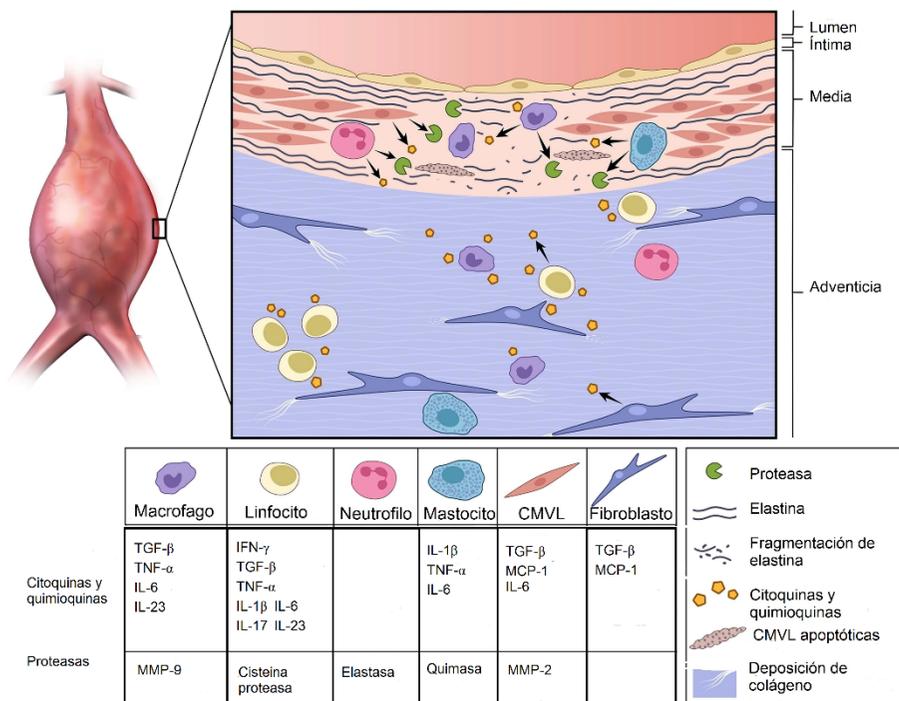


Figura 5. Fisiopatología del AAA. Esquema que muestra las interacciones de las principales células implicadas en la fisiopatología del AAA. Imagen adaptada de Davis *et al.* (58).

La progresión del AAA está también mediada por un componente inflamatorio. Muchos estudios han corroborado la importancia del infiltrado de las células inflamatorias (macrófagos, linfocitos T y B, e incluso neutrófilos) en las lesiones de AAA (59) (60). Parece que el proceso de reclutamiento de los leucocitos estaría promovido por niveles altos de IL-8, MCP-1, y RANTES (*Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*) en la zona de la lesión (61) (62) (63) y que diversas moléculas inflamatorias como TNF α , IFN γ , IL1 β , IL6 o protaglandina E2, que están incrementadas en el aneurisma, podrían inducir la expresión y la activación de las MMP (64) (65). El motivo principal por el que se inicia este proceso sigue siendo desconocido pero es probable que los péptidos solubles derivados de la degradación de los componentes de la matriz actúen como agentes quimiotácticos promoviendo la infiltración de macrófagos (66).

La disminución del número de las CMVL es un evento importante que también contribuye a la patogénesis de la enfermedad aneurismática (54) (67). Aunque aún no se conoce el mecanismo concreto que provoca la muerte celular de las CMVL, este proceso podría estar mediado por las células inflamatorias que al infiltrarse en la zona de la lesión, secretan citoquinas, perforina y FASL (*FAS-ligand*) e inducen la apoptosis de las CMVL. Además, la

presencia de CMVL apoptóticas a su vez favorece el reclutamiento de células inflamatorias que agravan la lesión. La apoptosis de las CMVL contribuye al debilitamiento de la pared arterial ya que supone la desaparición de las células capaces de reemplazar la matriz degradada (68) (69) (70) (71). En modelos animales se ha demostrado que la inhibición de la apoptosis de las CMVL reduce la formación del AAA (72).

Como efecto compensatorio de la pérdida de CMVL y de los componentes estructurales de la ME se produce una gran deposición de colágeno, principalmente colágeno tipo I y III, siendo este último el responsable de las características tensoras de la nueva matriz (73) (74). Debido a la desestructuración de la capa media la adventicia tiene que soportar unas fuerzas inusuales y termina generando respuestas angiogénicas, inmunes, inflamatorias y fibroticas, lo que potencia el desarrollo del AAA.

El desarrollo del AAA también va acompañado de un gran incremento de la neovascularización de todas las capas de la pared arterial (52) que se correlaciona con la degradación de la ME (75). La magnitud de la hipervascularización está directamente relacionada con la extensión del infiltrado inflamatorio y con la velocidad de expansión del aneurisma (76). El desarrollo de la angiogénesis requiere la degradación de la MB capilar y la degradación local de la ME por parte de las células inflamatorias y de las células de la pared vascular (77).

La consecuencia de todos estos procesos es la pérdida de elasticidad y resistencia del vaso que impiden la recuperación del diámetro arterial después de cada pulsación, favoreciendo la dilatación de la arteria. La aorta sufre fuerzas hemodinámicas que aumentan a medida que la onda de presión sanguínea se propaga por el vaso como consecuencia de la disminución del diámetro arterial (78). Además, el flujo reverso en cada pulsación genera estrés en la pared (36). Estas características, junto con la disminución del contenido de fibras de elastina y colágeno en la media y el engrosamiento de la íntima (79) explican la tendencia de la aorta infrarrenal a desarrollar aneurisma. Por otro lado, en la aorta abdominal, el contenido de elastina y colágeno disminuye con la edad (73) lo que explica el aumento de la incidencia de la enfermedad con la edad.

En los últimos años se está prestando mucha atención al trombo intraluminal (TIL) que se encuentra en el 75% de los AAA. Es un neot tejido biológicamente activo formado por múltiples capas de fibrina coagulada. Se ha asociado el TIL con la progresión y el riesgo de rotura del AAA (80). Su presencia provoca una disminución de la disponibilidad de oxígeno en la pared arterial (81) (82) y esto refuerza la reactividad de los macrófagos y su producción de elastasa (83). Además, también sirve de fuente de enzimas proteolíticas que secretan las células inflamatorias con las que está en contacto (83).

Tradicionalmente se ha considerado que la formación del AAA era una manifestación local de la aterosclerosis (84). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existen diferencias entre las dos patologías. Algunos estudios sugieren que la aterosclerosis en el AAA se desarrolla como consecuencia de la alteración del flujo luminal. Otros, que el AAA es una muestra local de una enfermedad vascular sistémica, ya que estos pacientes presentan afectaciones en todo el árbol vascular (37) (85).

Lo cierto es que ambas patologías afectan a las arterias, comparten factores de riesgo y exhiben un infiltrado de células inmunes e inflamatorias similar en la zona de la lesión. No obstante, sigue sin estar claro si las mismas vías inflamatorias resultan esenciales para la aterosclerosis y el AAA porque, en algunos casos, los mismos mecanismos promueven ambas enfermedades de manera uniforme, mientras que en otros funcionan de manera opuesta (86). En cualquier caso, la implicación de la aterosclerosis en el AAA es aún tema de debate.

4.2. Factores de riesgo

Aunque el AAA es una enfermedad con un fuerte componente genético (87) (88) (89) (90), existen factores de riesgo que influyen de manera importante en el desarrollo de esta enfermedad como la edad, el género masculino y el tabaquismo.

El consumo del tabaco incrementa el riesgo relativo de desarrollar un AAA 7.6 veces y cada año de edad el tabaquismo incrementa dicho riesgo un 4% (91). Aunque no se conozcan los mecanismos exactos a través de los cuales el tabaco desencadena la formación del AAA, se considera que puede estar relacionado con la inhibición de la síntesis de colágeno, con la alteración de la expresión de las MMP y con el estrés oxidante (92). Además, se ha asociado la exposición al tabaco con una alteración de la función de las células inflamatorias en modelos de AAA (93).

La susceptibilidad genética aumenta la prevalencia de AAA hasta un 15-19% entre familiares de primer grado (33) (94). La historia familiar de AAA en parientes de primer grado aumenta hasta 10 veces el riesgo de padecer AAA y a edades más tempranas (95). Esta predisposición podría tener un origen embrionario que se justificaría con alteraciones en las vías de señalización implicadas en la síntesis de elastina de la aorta, el fenotipo de las CMVL u otros factores como el TGF- β en la embriogénesis (96). Asimismo, diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la regulación epigenética en esta patología (57).

El hecho de que el AAA en mujeres se desarrolle aproximadamente 10 años más tarde, se ha atribuido a diferencias de los factores hormonales, en la susceptibilidad genética y en la exposición a los factores de riesgo entre los dos sexos (33).

Historia de aneurismas en otros territorios, la hipertensión, hipercolesterolemia y la obesidad son también factores de riesgo descritos en esta patología (37), junto con la enfermedad coronaria y la enfermedad arterial periférica (33). El riesgo de presentar un evento cardiovascular en estos pacientes es un 52% superior respecto a los pacientes que no presentan patología aneurismática (97).

Sin embargo, sobre la asociación entre los niveles plasmáticos de lípidos y el AAA existen datos contradictorios. Un estudio reveló que los niveles séricos de HDL (lipoproteínas de alta densidad) se asocian de manera independiente con una reducción del riesgo de AAA. Por el contrario, no se ha encontrado relación entre la presencia de AAA y los niveles de triglicéridos o colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) (33) (98).

Curiosamente, en contraste con su papel en la enfermedad aterosclerótica, la Diabetes Mellitus se considera un factor protector en la progresión de la patología (99) debido a su asociación con una menor prevalencia de AAA y, en el caso de que haya AAA, un crecimiento más lento del mismo. A pesar de que se desconozcan los motivos de este efecto, se ha propuesto que la medicación que se emplea en los pacientes diabéticos podría aumentar la estabilidad del TIL, la rigidez de la pared y reducir la inflamación. Asimismo, la presencia de los productos de glicosilación avanzada promueve la proliferación de las CMVL e incrementa el contenido de proteínas de la matriz en la pared del vaso (33) (100) (101).

4.3. Biomarcadores

Dado que la etiología del AAA sigue siendo un enigma en la actualidad (102) y que generalmente se diagnostica tras una prueba de imagen realizada por una patología concomitante del paciente, es importante trabajar en la identificación de biomarcadores para el AAA que permitan diagnosticar la enfermedad, valorar su progresión y el riesgo de rotura, así como determinar la respuesta al tratamiento de los pacientes (103).

El National Institutes Health (NIH) estableció la definición de biomarcador como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc. objetivamente medibles, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Existen diferentes tipos de biomarcadores:

diagnósticos, pronósticos o terapéuticos. El biomarcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico, estable *in vivo* e *in vitro*, no invasivo y que tenga suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica (104).

Actualmente los factores pronósticos del AAA se limitan al diámetro aórtico y a la velocidad de expansión del AAA mediante técnicas de imagen. No obstante, trabajos actuales proponen el análisis de los elementos finitos (FEA, *Finite Element Analysis*) para evaluar el riesgo de rotura. Soto *et al* (45) han demostrado que los valores de la tensión máxima de pared son más elevados en pacientes con AAA sintomáticos que en los asintomáticos. Dado que la presencia de síntomas se ha asociado con un incremento del riesgo de rotura, el valor de tensión máximo de pared es un potencial indicador de riesgo de rotura, y por ende, marcador pronóstico.

Entre los marcadores circulantes estudiados, por un lado están los marcadores relacionados con la degradación de la matriz extracelular, por ejemplo, los péptidos de elastina o el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III (33) que están elevados en el suero de los pacientes con AAA pero presentan una baja sensibilidad y especificidad. De igual manera, aunque se han asociado niveles elevados de las MMP-1 y MMP-9 con la rotura del aneurisma (105), un estudio con mayor tamaño muestral no encuentra correlación entre los niveles de MMP-9 en suero y la expansión del AAA (106).

También se han estudiado marcadores relacionados con la actividad protrombótica, como por ejemplo, la trombina-antitrombina, que indica la actividad plaquetaria en el AAA, y los complejos plasmina-antiplasmina y el dímero D, que indican la actividad biológica del TIL. Además, se ha encontrado correlación de los niveles de estos últimos con el diámetro de la aorta y el grosor del TIL (33) (107).

Por último, se han valorado marcadores relacionados con la respuesta inmuno-inflamatoria que se encuentran elevados en pacientes con AAA como el complejo α -1 antitripsina-elastasa, la mieloperoxidasa o la α -defensina, indicadores de la activación de los neutrófilos y citocinas, TNF- α e IL-6, proteína C reactiva, y las IgG4 e IgE como marcadores de la inflamación (33) (108).

Los niveles de la proteína NGAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) se han correlacionado con la presencia del AAA (109) y recientemente se ha sugerido que la quimioquina CCL20, cuya expresión aparece elevada en los pacientes con AAA, tiene una alta sensibilidad como biomarcador para el AAA (110).

No obstante, la búsqueda de biomarcadores circulantes en el AAA sigue siendo un reto (103) (111), aún no se conoce ningún marcador bioquímico con la suficiente especificidad y sensibilidad para tener una aplicación directa en la práctica clínica. Las evidencias apoyan el hecho de que presentar una combinación de varios marcadores bioquímicos permitiría identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar AAA.

4.4. Tratamiento médico

Hoy en día no existe ningún tratamiento capaz de modular la progresión del AAA. Los fármacos que se emplean en el tratamiento para el AAA son fármacos comercializados con otros fines, y si bien algunos han presentado efectos positivos en el AAA, existe una gran controversia acerca de los datos presentados.

Los medicamentos empleados se pueden clasificar en tres grupos: antihipertensivos, antiinflamatorios y la terapia anti-agregante (33).

Dentro de los fármacos antihipertensivos encontramos los bloqueantes de receptores beta adrenérgicos, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los bloqueantes de calcio.

Los más estudiados son los bloqueantes de receptores beta adrenérgicos, cuya efectividad parece estar relacionada con un efecto directo antiaterosclerótico. Estudios de cohortes empleando distintos betabloqueantes demostraron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento aneurismático entre los grupos en función de que recibiesen, o no, el tratamiento. Sin embargo, en menos de la mitad de los casos, esa diferencia resultó significativa (112) (113). En ensayos clínicos, en cambio, aunque el propranolol no haya presentado diferencias significativas acerca de la capacidad de reducir la velocidad del crecimiento aneurismático (114) (115), el metoprolol ha demostrado un efecto cardioprotector debido a su implicación en la respuesta de macrófagos y neutrófilos (116). Asimismo, las guías de la ACC/AHA (*American College of Cardiology/American Heart Association*) recomiendan la administración del bisoprolol durante el periodo perioperatorio debido a su efecto en la reducción de la mortalidad por causa cardíaca tras la intervención quirúrgica del AAA (117).

Por otro lado, los estudios de cohortes con los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), presentan resultados contradictorios (118) (119) (120) (121) y los ensayos clínicos realizados tampoco han demostrado resultados favorables (122). Lo mismo

ocurre con los bloqueantes de calcio (33), por un lado, se ha visto que el Nifedipino suprime la actividad del NF- κ B y de la MMP-9 inhibiendo así la progresión del aneurisma (123). Por el contrario, el Amlodipino, promueve la formación del AAA potenciando la actividad de la elastasa (124).

Respecto a los fármacos antiinflamatorios cabe destacar el uso de las estatinas y algunos antibióticos como por ejemplo, la Doxiciclina. La doxiciclina es capaz de inhibir las MMPs (33), hecho que se ha podido demostrar con estudios en modelos experimentales (125) (126) y en pacientes con AAA. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados más recientemente han demostrado lo contrario (127). Los estudios experimentales realizados con estatinas confirman que son capaces de reducir el crecimiento aneurismático (128), por lo que su uso está recomendado como tratamiento en los pacientes con AAA (33).

De igual manera, a pesar de que no exista una evidencia concluyente y los resultados sean contradictorios, se recomienda que los pacientes con AAA reciban dosis bajas de aspirina (117).

4.5. Nuevas dianas terapéuticas del AAA

Debido a la ausencia de fármacos eficaces que eviten la progresión del AAA, y que la única alternativa para evitar la muerte por rotura es la cirugía a costa de un elevado gasto socio-sanitario, es de vital importancia ampliar el conocimiento de las bases biológicas de esta enfermedad para contribuir en el desarrollo de nuevas intervenciones preventivas y terapéuticas. La identificación de dianas terapéuticas es clave para un abordaje farmacológico de la progresión del AAA que disminuirá el riesgo y la morbimortalidad y el coste financiero asociados a la cirugía.

La búsqueda de nuevas dianas terapéuticas se ha centrado en tres líneas de investigación, siendo la más estudiada, la modulación de la respuesta inflamatoria (33).

La interleuquina 1 β (IL-1 β) se encuentra elevada en el AAA a nivel clínico y experimental (33). Asimismo, la ausencia experimental de la IL-1 β y la de su receptor reducen la dilatación aneurismática, la infiltración de macrófagos y neutrófilos, y favorece el mantenimiento de la integridad de la elastina (129).

También se ha estudiado el potencial del TNF- α y el de otros miembros de esta superfamilia. El bloqueo del TNF- α parece que podría ser más efectivo que el de la IL-1 β por su papel en la polarización de los macrófagos (130), y porque estudios experimentales realizados con

Infliximab, un anticuerpo monoclonal capaz de inhibir su actividad funcional, han demostrado que limita la progresión del aneurisma (65).

Por otro lado, los niveles circulantes de la proteína TWEAK (*tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) soluble están asociados con la progresión del AAA (131) y la delección génica de TWEAK y de su receptor Fn14 en modelos experimentales murinos de AAA se asocia a una disminución del tamaño y de la progresión del AAA, así como de la respuesta inflamatoria (132).

La prostaglandina E2 también está asociada a los procesos inflamatorios vasculares en el AAA. Además, su receptor EP4 parece estar implicado en el desarrollo del aneurisma (133), ya que al reducir su expresión disminuye la dilatación del aneurisma y los niveles de IL-6, IL-17, MIP-1 α , MMP-2 y MMP-9 (134).

Respecto a los mediadores implicados en el reclutamiento de las células inflamatorias, se ha visto que la inhibición de la galectina-3, a través de la regulación del MCP-1, disminuye la progresión del AAA (135). La regulación de la polarización de las células T (ratio Th1/Th2) podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el AAA (136). Los linfocitos B también pueden ser de gran interés, ya que se ha demostrado que al eliminarlos se reduce la progresión del AAA (137).

La segunda línea de investigación es la de los reguladores epigenéticos. Anteriormente hemos subrayado que la patología aneurismática se caracteriza por un fuerte componente genético, pero al igual que el resto de las enfermedades cardiovasculares, en el desarrollo del AAA se producen interacciones entre los factores genéticos y los ambientales, donde los mecanismos epigenéticos cobran un papel importante. Entre éstos se encuentran las histonas deacetilasas (HDEACs) y los microRNAs (miRNAs), reguladores postranscripcionales de genes (33).

El papel de los miRNAs y su posible potencial como diana terapéutica en el AAA ha resultado de gran interés en los últimos años (138) pero se cree que la traslación a la práctica clínica podría ir acompañada de efectos colaterales severos (33). Por otro lado, los estudios realizados en un modelo experimental en ratón de AAA han demostrado que el tratamiento con inhibidores de HDEACs limita el desarrollo de la patología sugiriendo una nueva estrategia terapéutica eficaz para el AAA (139).

Por último, la línea de la terapia celular ha abierto otra vía terapéutica para el AAA, como en el caso de otras muchas enfermedades. Las células madre de tipo mesenquimal se caracterizan por la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares, y además presentan actividad antiinflamatoria e inmunoreguladora. Los resultados de un estudio

realizado con modelos animales murinos de AAA demostraron que la administración intravenosa de células mesenquimales retrasaba el desarrollo del AAA (140). Asimismo, hay un ensayo clínico en marcha para probar la eficacia de este tratamiento en pacientes con AAA pequeños (141).

5. El MCAM/CD146

El CD146 (*Cluster of differentiation 146*) es una glicoproteína integral de membrana. Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), que junto a las selectinas, integrinas, y cadherinas, conforman las 4 familias de moléculas de adhesión (CAM, *cell adhesion molecule*) identificadas (142) (143).

El CD146, también conocido como MCAM (*Melanoma Cell Adhesión Molecule*), fue descrito por primera vez en 1987 con un anticuerpo monoclonal obtenido inmunizando ratones con un lisado celular de melanoma humano metastásico que reconocía una glicoproteína, MUC18, capaz de discriminar en células de estirpe melanocítica entre malignas y benignas (142) (144). Shih *et al.* (145) (146) identificaron la misma molécula (MUC18) como un antígeno asociado al potencial metastásico de las células de los tumores del melanoma humano y denominaron a este antígeno A32. Otro estudio demostró que al inyectar células de melanoma humano que expresaban CD146 en ratones *nude* el número de metástasis que se formaba era mucho más elevado que al inyectar células que no lo expresaban (147).

Debido a las características de CD146 como una molécula de adhesión y su papel en la modulación de la metástasis tumoral, se le han asignado los siguientes sinónimos: MCAM o Mel-CAM (148) (149), y MET-CAM (150). Por último, se la denominó S-Endo-1 por el hecho de expresarse de forma constitutiva en todos los tipos de células endoteliales humanas (151).

En el ser humano el gen de CD146, *MCAM*, está localizado en el brazo q23.3 del cromosoma 11. En ratones, en cambio, se encuentra en el cromosoma 9 (152). La secuencia codificante es de ~14 kb (153) y consta de un total de 16 exones (154) que codifican una región extracelular, un dominio transmembrana, y una región citoplasmática (155). La región extracelular está codificada por 13 exones, mientras que la codificación de las regiones transmembrana y citoplasmática depende de 3 exones. La región extracelular a su vez, está compuesta por 5 dominios del tipo inmunoglobulina, 2 dominios variables (V) y 3 dominios constantes (C-2), que debido a la estructura del gen están codificados por más de un exón. De esta manera, el primer conjunto V y los tres conjuntos C-2 están codificados, cada uno,

por 2 exones, mientras que el segundo conjunto V, está codificado por 3 exones (143). El exón 16 contiene una región 5'-UTR de más de 1 kb (Figura 6).

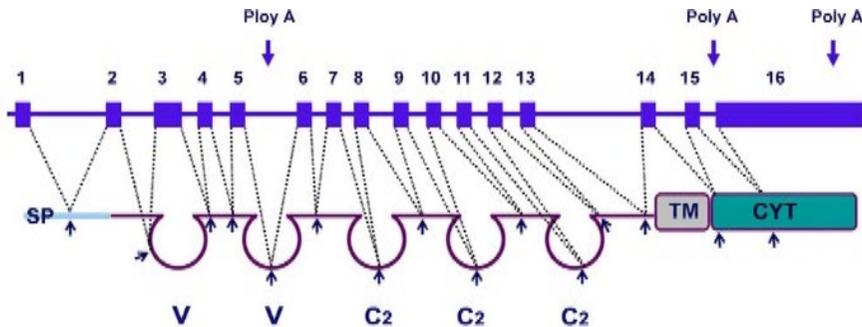


Figura 6. Estructura intrón-exón del gen *MCAM* y de la proteína *CD146*. Los cuadrados azules representan los exones, las líneas ininterrumpidas los intrones y las líneas interrumpidas el inicio y el final los exones. SP, péptido señal; V, región variable del dominio Ig; C-2, región constante del dominio Ig; TM dominio transmembrana; CYT, dominio citoplasmático. Imagen adaptada de Wang *et al.* (143).

La secuencia de la región promotora, comienza a unos 505 pb por delante del primer ATG carece de las cajas TATA y CAAT y es rica en CGC (143). Asimismo, contiene varios motivos de unión consenso reconocidos por los factores de transcripción AP1 (153), SP1, AP-2, CREB (156) (157) y c-Myb, así como los motivos de la caja CArG (154) responsables de la regulación diferencial de CD146 (Figura 7). Por último, el gen contiene tres señales poli (A) de las cuales 2, curiosamente, se encuentran entre las secuencias no codificantes de los intrones 5 y 15 (154).

```

-905 CTGCAGGTAACGGATCAGCGCTGCCGGGATCCTTTCAATCATCAGGAACAGCAACAGGT
-846 TTGCAGGGTCAGGCTGGGGACCCCTCGCCATTAACCTTTCTTCTCCCTGTTTCTTTCT
-787 CTTAGGTGAGGGGAAACTGAGTTCAGGGTAGGCTCCAGAGTGAAGAGGGAAAGAAACAT
-728 GATTCTCAAGGCCAGGTCTGGACAAGTGTGAACACCTTGGGCCCTGCGAATTAGCCCCC
-669 TCCTTCCTTTCTCTGGTCAAAGGCTAGACTTGCAGGAGCTTGCCTTTGAAGGGACAGCC
-610 CAGAAGGCATCGTCTGCACTCCCATACAGGTACTTCTGGGTCTGTGGGACTGGCGCAG
      CArG
-551 GGTTCCTTCTCCCAAAGCTGCCAGCACTGAGGCTGAGGCAGTGTCAGGCCGGCCGGCAGCG
      AP 2
-492 GCAGTGGTGCAATCGTTCTGGGAAGCATAGTGGCCGGCTGAATTCTCTGTGGCAAGGG
      OCT
-433 AGGGGAGCCCAAGTGGGAGGCCCTTGGGGACACCGAGGACCAGGTCCGCTACTGTCTCC
      AP 2
-374 TCCCCCAGGAGGTCCCTAGGGGCTACATTGGCTGGCAGGGGCTGAGCAGCGGTGAGCC
-315 TGGCTGGCTTCGACCCGGGGCGACTCCGGGCATCCGGGACAGCTTCTCCTCGCTGCCAC
-256 CTCGGCCAGTCAGACCCCGAGACACCTGTCACTACCCCTCAGCCTTCCAAGCCAGGA
      c- myb      CArG
-197 GCCTGGGAGTCCGGCTCTGGCCTACCTCCGGCAGCGCTCCTAGGCGCACGTCCCGGGCT
-138 GCGGCGCCCGGGCCCGCCCCCTAGGGCTGCGGCGCGCGGGGGGGCTGGGGGTGCG
      AP 2      Sp1      Sp1
- 79 CGGGGCGGGGGCGGCCCGGGCGCTCCGGGCCCCCTCCCGCCCCCTGACGTCAGCCC
      Sp1      Sp1      Sp1      CRE
- 20 CCGGCAGCCTCGAGCTGCTCACTTGGCTCTCGCCCTCCGGCCAAGC ATG GGG
      AP 2      +1      M G

```

Figura 7. Secuencia de la región promotora del gen *MCAM*. La secuencia incluye 905pb previos al 5', el primer exón, y los motivos de unión de los factores de transcripción: Sp1 (subrayado); CRE, elemento respuesta cAMP (cuadrado); AP-2 (en cursiva y subrayado interrumpido); OCT, octamero relacionado (doble subrayado); c-Myb (subrayado con puntos); caja CArG (subrayado y entre paréntesis). La flecha negra indica la región inicial de transcripción (+1). Imagen adaptada de Sers *et al.* (154).

Los 4 sitios SP-1, 4 elementos AP-2 y un elemento de respuesta AMPc constituyen el promotor mínimo para la transcripción de CD146 (152). La mutación en el sitio CRE produce una reducción del 70% de su actividad, y 2 sitios AP-2 son los responsables de la inhibición del 70% y 44% de la actividad de CD146 (152) (157).

La estructura del gen en humano (154), ratón (158) y pollo (143) (159) es similar. Las regiones codificantes y la región 5'UTR del gen de CD146 humano y de ratón, comparten una homología aproximada del 80 y 72%, respectivamente. El fragmento 3'UTR, en cambio, presenta una homología del 31% (153). La secuencia del gen humano presenta una extensión en las regiones 3' y 5' UTR junto a una pérdida de 6 pb en el exón 2 que no se observa en la secuencia del gen en ratones. Se han identificado 6 polimorfismos de

nucleótidos simples (SNP) en la región promotora del gen de la proteína CD146 en humanos (160).

El tamaño del ARN mensajero de CD146 es de ~ 3.3 kb, y su región codificante es de ~1941 pb (152) (153).

5.1. La proteína CD146 y sus isoformas

La secuencia de la proteína CD146 está compuesta por un dominio extracelular de 558 aa, un dominio transmembrana hidrofóbico de 24 aa (559-582) y un dominio C-terminal citoplasmático (161). La región extracelular a su vez, la componen un péptido de señal (SP) de 28 aa y 5 dominios del tipo inmunoglobulina, 2 dominios variables (V) y 3 dominios constantes (C-2) (Figura 6) (144) (152) (162) que contienen 8 sitios de n-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr) en las posiciones 56, 418, 449, 467, 508, 518, 527 y 544 de la secuencia (161) y representan aproximadamente el 35% del peso molecular de la proteína que es de 113 KDa aunque, teóricamente, tiene un peso de 72 KDa (163).

En humanos, así como en las especies aviar, canina y murina (143), se han identificado 2 isoformas de membrana de distinto tamaño que se generan por *splicing* alternativo en el exón 15. Ambas tienen la misma secuencia extracelular y transmembrana, la diferencia se encuentra en la región citoplasmática (152) (164). La región citoplasmática de la isoforma larga consta de 63 aa, y contiene 2 sitios de fosforilación para la proteína quinasa C (dominio PKC) y una secuencia de señal de endocitosis (motivo de dileucina), mientras que la isoforma corta tiene 21 aa, 1 dominio PKC y un dominio de unión PDZ (165) (Figura 8).

Además de la proteína de membrana, en 1998, se identificó una forma soluble, sCD146, en sobrenadantes de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en cultivo y en plasma de individuos sanos (166). Esta forma carece de las regiones citoplasmática y transmembrana y su peso molecular es de alrededor de 100 KDa.

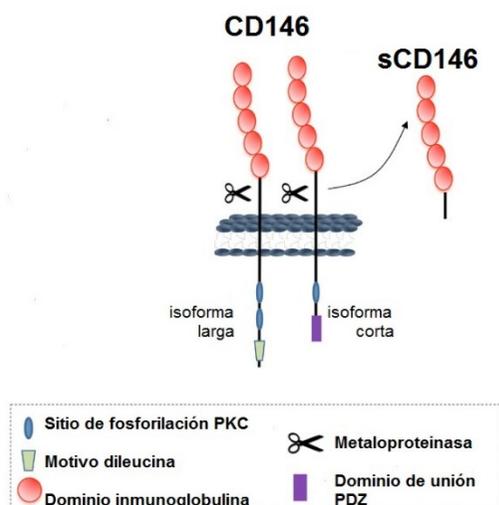


Figura 8. Las isoformas de la proteína CD146. Se muestran las formas de membrana, larga y corta, y la forma soluble de CD146 junto con las características de las regiones que las constituyen: región extracelular, transmembrana y citoplasmática. Imagen adaptada de Leroyer *et al.* (152).

En referencia al origen de sCD146, se sabe que en la especie aviar, proviene de un mecanismo de *splicing* del ARN mensajero (159) (167) (168), y se ha detectado en las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea embrionaria. En humano en cambio, las evidencias apoyan que el dominio extracelular de la proteína se libera de la membrana celular mediante proteólisis mediada por MMP (153) (167) (168). De hecho, el uso del inhibidor no específico de metaloproteinasas (GM6001) inhibe la formación del sCD146 (169).

5.2. La expresión de CD146 y sus funciones

El CD146 se identificó por primera vez en el melanoma humano (142) (144), pero posteriormente también en otros tipos de cáncer como de páncreas, mama, próstata, ovario, pulmón, riñón, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, angiosarcoma, leiomyosarcoma y tumores de las células Schwann (153). De hecho, actualmente se conoce como un biomarcador de pronóstico tumoral (143).

En sangre periférica los linfocitos B y T expresan CD146 y su expresión aumenta cuando son activados. También se expresa en células mesangiales glomerulares, células Schwann, trofoblastos intermedios, células madre mesenquimales, progenitores endoteliales, y en gran cantidad en las CMVL, pericitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos (151) (153) (170). El CD146 se expresa en todo el árbol vascular sea cual sea la ubicación anatómica y el calibre del vaso siendo clave para la estructura del mismo (152).

Aunque su función no está claramente establecida, es una molécula multifuncional que participa en procesos como la adhesión celular, la transducción de señal, diferenciación, migración y proliferación celular, y activación, permeabilidad y migración de linfocitos (143) (153) (171). Por ello, ha aumentado el interés por el estudio de su papel en el desarrollo embrionario, en cáncer y en funciones como la respuesta inmune, transducción de señal y angiogénesis (143).

Las propiedades adhesivas, tanto homo como heterofílicas, del CD146 se han estudiado mediante ensayos de agregación celular y de unión a fase sólida. Primero se descubrió que la unión CD146-CD146 está involucrada en la extensión neurítica y en el desarrollo de las neuronas en las especies aviares. Asimismo, se identificó el factor de crecimiento neurítico (NOF, *neurite outgrowth factor*), una proteína de la ME que pertenece a la familia de las lamininas, como el primer ligando de CD146 en retinas embrionarias en pollos. En humanos también se ha observado que la unión CD146-CD146 está implicada en el control de la cohesión celular y se ha descrito que el CD146, a través de su unión a la laminina 411, facilita la entrada de las células T en el sistema nervioso central. Además, se ha demostrado que el CD146 se expresa en la vasculatura del sistema nervioso central, sugiriendo que puede promover el desarrollo del sistema nervioso facilitando la adhesión de las neuronas y las células gliales con las células endoteliales en la vasculatura (143).

A diferencia de otras CAM que se expresan en abundancia en los tejidos adultos normales la expresión de CD146 se encuentra restringida. Por el contrario, está ampliamente expresado durante el desarrollo embrionario (142) (144). Los tejidos embrionarios, epitelio del sistema nervioso en ratas (172), y de la tráquea y del riñón en pollos, presentan unos niveles de expresión de CD146 elevados respecto a los tejidos adultos (143) (173). Asimismo, estudios realizados con embriones humanos también han revelado que los niveles de CD146 disminuyen a lo largo de las diferentes etapas que conforman el desarrollo (142) (144), indicando que tiene un papel fundamental en la organogénesis (143) (158).

La región promotora del gen de CD146 contiene múltiples sitios de unión de AP-2, un factor de transcripción crucial en el desarrollo embrionario, lo que explica que el CD146 esté aumentado en dicho proceso (143).

El CD146 se ha identificado como un marcador de las células madre mesenquimales (CMM) aisladas de diferentes órganos adultos y fetales. Su expresión se ha vinculado con la multipotencia ya que las células con mayor potencial de diferenciación, expresan mayores niveles de CD146 en la superficie celular (174). Subpoblaciones de CMM caracterizadas por altos niveles de expresión de CD146 dan origen a un linaje de CMVL (175). Asimismo, las células perivasculares del cordón umbilical presentan niveles de CD146 más altos que las CMM de la médula ósea y una mayor capacidad de diferenciación osteocítica, condrocítica y adipogénica (176). Todo esto sugiere que el CD146, además de estar implicado en la organogénesis, podría estar activamente implicado en los procesos de diferenciación (143).

El CD146 activa diferentes cascadas de señalización que producen la activación de rutas específicas de transducción de señal. Por ejemplo, en las células endoteliales activa la cascada de fosforilación de la proteína quinasa, a través de la activación de Fyn (figura 9a), promoviendo la motilidad celular a través de la remodelación del citoesqueleto de actina (177) (178).

En células del melanoma humano (179) la sobreexpresión de CD146 activa la cascada PI3K/AKT endógena. A su vez, la fosforilación de PI3K/AKT induce la expresión de CD146 dando lugar a una retroalimentación positiva. Esto inhibe la apoptosis de las células tumorales favoreciendo el desarrollo tumoral (Figura 9b). El CD146 también contribuye a la metástasis regulando a la baja la expresión del ATF-3, un inhibidor transcripcional de Id-1 (inhibidor de la proteína de unión al ADN). Id-1 es un oncogen que se encuentra sobreexpresado en el melanoma humano (Figura 9c). Sin embargo, no sabemos si el CD146 juega un papel en la regulación de las metástasis de otros tipos de tumores malignos (180).

Asimismo, el CD146 participa en la proliferación celular, migración y formación de vasos, por lo cual juega un papel clave en la angiogénesis (181) (182). Actúa como correceptor del VEGFR2 y favorece la transducción de señal del VEGF en células endoteliales (183) a través de la unión de alta afinidad a la netrina-1 (184). También activa la vía de señalización VEGFR/NF- κ B como correceptor del VEGFR2 (185), lo que sugiere que es un potencial biomarcador de la angiogénesis tumoral (Figura 9d) (186). Y su sobreexpresión promueve el proceso de transición epitelial-mesenquimal mediante la inducción de la expresión del factor de transcripción Slug (187) (188) (Figura 9d).

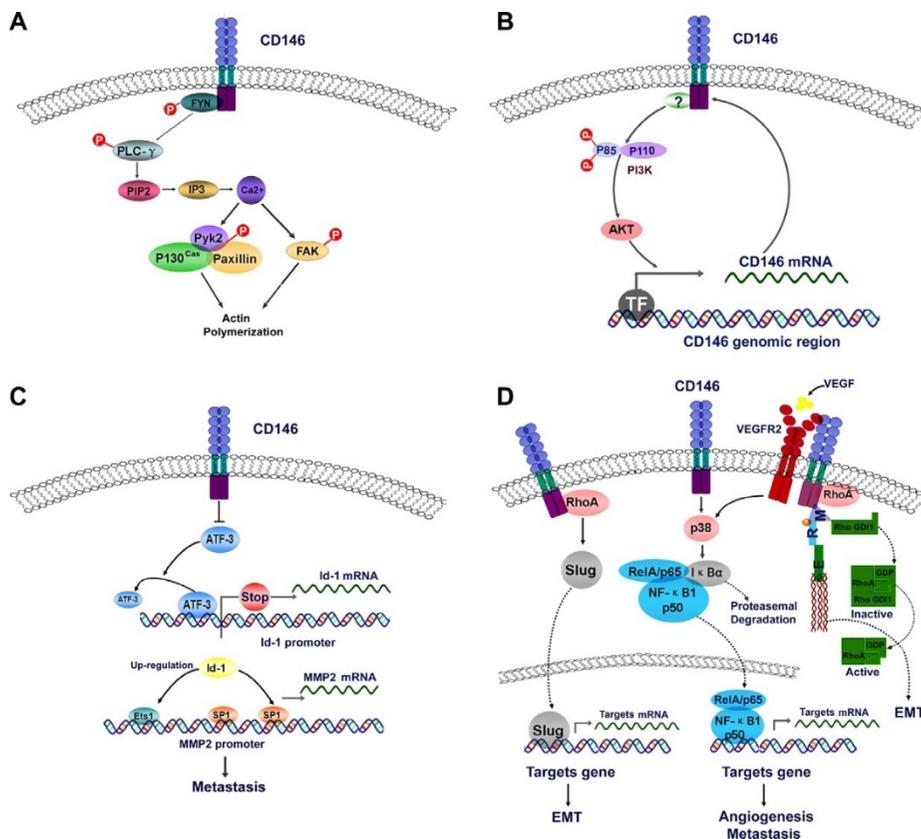


Figura 9. Vías de señalización mediadas por el CD146. a) El CD146 estimula la fosforilación de tirosina quinasa de adhesión focal p125 (FAK) a través de Fyn en células endoteliales humanas. b) El CD146 y el AKT presentan una regulación recíproca en las células del melanoma humano. c) El CD146 favorece la inducción del Id-1 a través de la inhibición del ATF-3 y promueve la metástasis en el melanoma humano. d) El CD146 promueve el proceso de transición epitelial-mesénquimal de las células endoteliales a través de Slug; y activa la vía del factor de transcripción NF-κB a través de la activación de la quinasa p38. Imagen de Wang *et al.*(143).

La expresión del CD146 está regulada por factores proinflamatorios como el TNF α , la IL-13, el TGF- β , la proteína morfogenética ósea 4 (BMP4) y las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL) (152) (189) (190). El factor de crecimiento del músculo liso endotelina-1, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y señales ambientales como, la presión osmótica y niveles altos de glucosa (191), de AMPc (148) y de Ca⁺⁺ (163) también actúan aumentando los niveles de ARNm de CD146 en varios tipos celulares (192) (193) (194) (195). Por el contrario, el factor de transcripción ZBTB7A, la activación de CD44 y la sobreexpresión de la proteína de choque térmico 27 (Hsp27) suprimen la expresión del CD146. Asimismo, se han

identificado 2 microRNAs que inhiben la expresión de CD146, miRNA-329 y miRNA-573 (196) (197).

La expresión inducible de CD146 en el tejido normal adulto sugiere que juega un papel importante en la respuesta a estímulos ambientales promoviendo reacciones inflamatorias, proliferación celular y comunicación intercelular (143). Numerosos trabajos se han centrado en estudiar el papel del CD146 en la regulación de la respuesta inflamatoria (198). Se han observado niveles aumentados de CD146 en reacciones inflamatorias activas y en procesos inflamatorios crónicos (199), en artritis reumatoide (200), en la enfermedad inflamatoria intestinal activa (167) (168), en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (201) y en la esclerosis múltiple (25) (202).

Guezguez *et al.* (203) demostraron que el CD146 está implicado en el reclutamiento de los linfocitos T activados a los sitios de inflamación favoreciendo el rodamiento y la adhesión a la proteína 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) mediante la inducción de microvilli. Asimismo, demuestran que interacciones homofílicas CD146-CD146, linfoide y endotelial, podrían participar en la interacción linfocito-endotelio. Aparte de favorecer el reclutamiento de las células inmunes, el CD146 juega un papel en la extravasación o diapédesis de las células T activadas (170).

Además, se ha observado que tras una reestimulación de las células T de memoria humanas *in vitro*, las células que expresan CD146 son las que presentan la capacidad de secretar IL-17, y sugiere que el CD146 facilita la entrada de las células TH17 en los tejidos favoreciendo la inflamación (25).

El CD146 es un marcador de linfocitos NK (*Natural Killer*) en ratones (204). Los linfocitos NK CD146+ cuando son estimulados son menos citotóxicos y producen menos IFN- γ que los CD146-. Además, linfocitos NK transfectados con CD146 presentan una velocidad de rodamiento disminuida y un aumento de la adhesión a células endoteliales y de la formación de microvellosidades, características importantes en la extravasación de leucocitos (205).

Por otro lado, en células endoteliales en cultivo, se ha demostrado que la forma soluble de CD146, sCD146, en congruencia con la forma de membrana, participa activamente en el proceso inflamatorio dado que incrementa la permeabilidad endotelial y estimula la trasmigración de monocitos (168). Otro estudio realizado con un modelo de isquemia demostró que el sCD146 posee propiedades quimiotácticas y angiogénicas, efectos aditivos con el VEGF, que requieren la expresión de CD146 y van asociados a la inducción de genes proangiogénicos (206).

En el líquido sinovial de pacientes en fases iniciales de artritis reumatoide se han descrito niveles altos de sCD146 (200). CD146/sCD146 es un biomarcador de la esclerosis sistémica, un trastorno autoinmune que se caracteriza por presentar daño vascular (152). Asimismo, la sobreexpresión de CD146 y sCD146 se ha correlacionado con patologías asociadas a lesión endotelial (198).

El CD146 y su forma circulante, sCD146, se correlacionan positivamente con el desarrollo de la inflamación e inestabilidad de la placa en la aterosclerosis en humanos (207) (208). Quian *et al.* (207) revelaron que la sobreexpresión de CD146 se asocia al infiltrado de macrófagos en la placa carotídea. La sobreexpresión de CD146 en los macrófagos promueve la absorción de lípidos y favorece la formación y la retención de las células espumosas en la placa durante la aterosclerosis. Lo que sugiere su papel proangiogénico (209). Por el contrario, otro estudio ha demostrado que la deficiencia constitutiva de CD146 provoca un incremento de los niveles circulantes de RANTES y el reclutamiento y acumulación de neutrófilos y macrófagos en la placa de ateroma favoreciendo su progresión e inestabilidad (198).

Curiosamente, un estudio preliminar demostró que los niveles de ARNm de CD146 son significativamente inferiores en biopsias de arterias con enfermedad aterosclerótica dilatada en comparación con los niveles de arterias con enfermedad aterosclerótica estenótica que presentan angiogénesis colaterales. Este trabajo apoya la idea de que el CD146 actúa como proangiogénico durante la aterosclerosis (210).

En cualquier caso, estos datos indican que el CD146 y su forma circulante, sCD146, son actores importantes en la estructura del vaso, angiogénesis e inflamación (152) por lo que las alteraciones en su expresión podrían jugar un papel en el desarrollo de las patologías vasculares.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) constituye una patología de evolución larvada cuya manifestación clínica más temida, la rotura, se asocia a una elevada mortalidad (75%) (33).

A pesar de los avances producidos, no existen tratamientos farmacológicos que permitan prevenir la aparición o detener el crecimiento del AAA siendo la única solución la reparación quirúrgica. Al ser una enfermedad asintomática, las herramientas disponibles para su detección se reducen al rastreo poblacional lo que hace necesario la identificación de biomarcadores circulantes que ayuden en el diagnóstico y/o pronóstico.

Tanto la remodelación de la ME por la acción de las MMP (66), como las alteraciones en la función contráctil de las CMVL (3) representan procesos fundamentales en la formación y desarrollo del AAA.

En condiciones patológicas las CMVL sufren cambios fenotípicos relacionados con la interacción de las células con proteínas de la ME y MB, como las lamininas. Las lamininas, además de participar en el autoensamblaje de la MB confiriéndole estabilidad estructural (22), participan en la adhesión y la migración celular y regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (24) a través de la unión a receptores de superficie celular (21).

El CD146 es una molécula de adhesión celular implicada en la unión de célula-célula y célula-ME. Se localiza en el sistema vascular y está ampliamente expresado en las CMVL (151). Se conoce como receptor de las lamininas 411 y 421 (24) y está implicado en funciones como la adhesión, diferenciación, migración y proliferación celular, angiogénesis y la inhibición de la apoptosis (153) (143) (171) (179). Además, los niveles de CD146 y los de su forma circulante (sCD146) (166), se han asociado con el desarrollo de patologías inflamatorias que presentan daño vascular y con la inestabilidad de la placa en la aterosclerosis (152) (207) (208) (209) (210).

Nuestra hipótesis es que las CMVL juegan un papel fundamental en el desarrollo del AAA y que el estudio de la expresión y actividad del CD146 y de su forma soluble en el AAA puede aportar información muy valiosa para el conocimiento de esta enfermedad. Con este trabajo pretendemos profundizar en el conocimiento de la biología del AAA, aportar conocimientos necesarios para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas que posibilitarán la generación de fármacos que eviten la aparición y/o la progresión del AAA y evaluar el sCD146 como biomarcador diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad.

En este contexto, nos planteamos los siguientes objetivos:

- I. Comparar la estructura de la pared vascular y los niveles de ARN mensajero de las cadenas α de las lamininas y del receptor DAG-1 en tejidos de aorta humana de AAA y de aortas sanas procedentes de donantes multiorgánicos (AN).
- II. Estudiar la expresión de CD146 y su relación con el fenotipo de CMVL en cultivos primarios de CMVL tratados y no tratados con TGF- β 1 y en tejidos de AAA y AN.
- III. Estudiar el efecto de la expresión de CD146 sobre la regulación del fenotipo y las funciones celulares asociadas a la fisiopatología del AAA, adhesión, migración, proliferación y apoptosis en CMVL en cultivo.
- IV. Analizar los niveles plasmáticos de la forma circulante de CD146, sCD146, en pacientes con AAA e individuos sanos y evaluar su capacidad como biomarcador diagnóstico de la enfermedad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras de pacientes: tejido de aorta y plasma

Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Sta. Creu y Sant Pau y las muestras se han obtenido con el consentimiento informado de los pacientes.

Se recogen biopsias de aorta infrarrenal de pacientes con AAA, intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía Vasculardel Hospital de la Sta. Creu y Sant Pau, y tejidos de aorta normal, procedentes de donantes multiorgánicos del Servicio de trasplantes del mismo Hospital, con previa firma de consentimiento informado de los parientes.

Inmediatamente después de la extracción de la biopsia se realiza el procesamiento y almacenamiento de la misma. En condiciones de esterilidad el tejido se lava con tampón fosfato (PBS) para eliminar la sangre, y se trocea en segmentos que se procesan para obtener ARN, proteína y secretomas, o realizar estudios inmunohistoquímicos.

- Un trozo de tejido de aproximadamente 3 x 3 mm se sumerge en 1 mL de RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) durante 24 horas a 4 °C, para estabilizar el ARN. Transcurrido ese tiempo se extrae el líquido y el tejido se guarda a -80 °C hasta su procesamiento.
- Para la obtención de los secretomas, 100-200 mg de tejido se incuban a 37 °C con 1 mL de medio DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) sin suero fetal bovino (SFB) conteniendo penicilina (100 U/mL)-estreptomicina (10000 U/10000 µg), L-glutamina 2000 mM y Piruvato Sódico 100 mM durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se recupera el medio y se almacena a -80 °C hasta su posterior análisis.
- Para los estudios de proteína el tejido se congela a -80 °C.
- Para los estudios inmunohistoquímicos el tejido se sumerge en una solución de formaldehído al 4% durante 24 horas y posteriormente se incluye en bloques de parafina para su conservación.

Los plasmas de los pacientes con AAA se obtienen en el momento de la operación quirúrgica en el Servicio de Cirugía Vascular del Hospital de la Sta. Creu y Sant Pau, y los plasmas de controles sanos, proceden del banco de sangre. Se extraen 10 mL de sangre periférica en tubos con heparina como anticoagulante que inmediatamente se centrifugan a 1500 x g durante 10 minutos a 4 °C. El plasma se alícuota y se guarda a -80 °C hasta su análisis.

2. Cultivo de células musculares vasculares lisas

2.1. Obtención del cultivo primario

Las CMVL humanas se obtienen de tejido de aorta de donantes multiorgánicos mediante la técnica de explantes.

En condiciones de esterilidad, se elimina la grasa y la capa adventicia adheridos. El vaso se abre longitudinalmente y se raspa la superficie interior con un bisturí para eliminar las células endoteliales. La capa media se trocea en pequeños segmentos de aproximadamente 2 mm² de área que se colocan en frascos de cultivo de 75 cm² y se deja durante 2 horas para que se adhieran. A continuación se añade el medio de cultivo de crecimiento suficiente para que cubra las piezas de tejido y se mantienen en la estufa de CO₂.

El medio de crecimiento se prepara con medio M199 Earl's Salts suplementado con 15% de SFB, Sodio Piruvato 1mM, L-Glutamina 2mM y penicilina-Streptomicina 100 U/mL-100 µg/mL (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemet, Israel), y se cultivan a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

Se cambia el medio cada 3 días hasta que las células empiezan a migrar del explante y a proliferar.

2.2. Mantenimiento de las CMVL

Una vez alcanzan la confluencia, las células se subcultivan. Se descarta el medio y los cultivos se lavan con PBS, previamente atemperado a 37 °C, se añade 1 mL de Tripsina 0.25%-EDTA 0.02% y se incuba 5 minutos a 37 °C y 5% de CO₂, observando al microscopio hasta que las células se desprenden. Cuando las células se han desprendido, se añade medio de crecimiento y se recuperan las células que se traspasan a un tubo estéril.

Una alícuota de la suspensión celular se diluye 1:1 con una solución de azul de Tripán (Trypan Blue solution 0.5%, SERVA), para determinar la viabilidad celular, y el número de células se cuenta en el microscopio óptico invertido con una cámara de Neubauer (BRAND GmbH).

Las células se siembran en frascos de 75 cm² a la densidad de 7000 células/cm² con medio de crecimiento. Cuando los cultivos alcanzan de nuevo la confluencia, se vuelven a tripsinizar. Una parte se mantiene en cultivo y otra se congela para su utilización posterior.

Para congelar las células, los cultivos se tripsinizan, se cuenta el número de células y se centrifugan a 270 x g durante 10 minutos. El botón celular se resuspende, a la concentración deseada, en SFB con 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector, suavemente, evitando pipeteadas vigorosas. Primero se guardan a -80 °C durante una noche y después se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido durante, incluso, años.

2.3. Sobreexpresión proteica en CMVL en cultivo mediante transfección transitoria

2.3.1. Transformación de bacterias competentes y obtención del ADN plasmídico

La transformación de las bacterias competentes se realiza por choque térmico. Las bacterias competentes DH5 α (Invitrogen) se descongelan en alícuotas de 50 μ L en hielo. A continuación, se añade 20 ng del ADN de los vectores a transformar (tabla1) a cada alícuota y se incuban en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se someten a un choque térmico durante 20 segundos a 42 °C, seguido de 2 minutos en hielo.

Las bacterias se recuperan con 950 μ L de medio Luria Bertain (LB) y se incuban a 37 °C en agitación durante 1 hora. Seguidamente, se siembra una cantidad determinada de la solución de las bacterias en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado para la selección, en este caso 0.1 mg/mL de ampicilina, y se incuban o.n. a 37 °C.

Al día siguiente, se escogen unas colonias aisladas de cada placa, se pican y se dejan crecer en 5 mL de LB con 0.1 mg/mL de ampicilina a 37 °C en agitación durante el día. Por la tarde, se seleccionan las soluciones más turbias, se pasan a un frasco de 75 cm² que contiene 100 mL de LB conteniendo 0.1 mg/mL de ampicilina y se incuban a 37 °C en agitación o.n. Una parte de estas soluciones, tal y como se especifica más adelante, se emplea para purificar el ADN plasmídico.

Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones de esterilidad.

La solución de las bacterias incubada se pasa a uno o varios tubos de 50 mL y se centrifuga a 3000 x g durante 15 minutos. De los precipitados obtenidos se realiza la purificación del ADN plasmídico con el kit de midiPrep (PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN obtenido se diluye en tampón TE (tris-EDTA) y se cuantifica con el espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific). Finalmente, cada ADN se separa en alícuotas, una alícuota para conservar a -20 °C y otra, a 4 °C para emplearla en los ensayos de transfección celular.

Características comunes	Características individuales	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> - <i>True ORF cloning vector</i> - El producto se expresa sin <i>tag</i> - Promotor de citomegalovirus (CMV) - Secuencia Kozak para la expresión de proteínas mamarias - Múltiples sitios de clonación - Selección procariota: Resistencia a la Ampicilina 	pCMV6-AC-Ø	
	<ul style="list-style-type: none"> - Selección eucariota: Resistencia a Kanamycina 	<ul style="list-style-type: none"> - ORIGENE - #PS100020
	pCMV6-XL4-MCAM	
	<ul style="list-style-type: none"> - Selección eucariota: Resistencia a la Neomicina - Contiene la construcción del ADNc: MCAM humano sin <i>tag</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - ORIGENE - #SC116067

Tabla 1. Características de los vectores y las construcciones de ADN empleadas.

2.3.2. Comprobación del ADN plasmídico por gel de agarosa

Para comprobar que el ADN obtenido pertenece a los plásmidos empleados, se realizan digestiones con enzimas de restricción (tabla 2). Los enzimas se escogen tras estudiar el mapa genético de cada uno de los plásmidos y la reacción se hace en un bloque térmico a la temperatura óptima para cada enzima durante 2 horas.

Los productos digeridos se analizan por electroforesis en gel de agarosa (figura 10). Y una vez confirmado que los ADN son los correctos, se genera el stock de bacterias con glicerol al 15%, que se preservan a -80 °C (la parte restante de las soluciones empleadas para purificar el ADN), y el ADN obtenido se alícuota. Una parte del ADN se guarda a -20 °C, para conservar, y la otra a 4 °C para emplearlo en los ensayos de transfección celular.

VECTORES	REACCIÓN	VOLÚMEN	TEMPERATURA (°C)
PCMV6-AC-Ø			
DIGESTIÓN 1	Tampón D 10% Not I (Promega) ADN H ₂ O	1 µL 0.2 µL 0.6 µg Hasta 20 µL	37 °C
DIGESTIÓN 2	Tampón H 10% Eco RI (Promega) Pst I (Promega) ADN H ₂ O	1 µL 0.2 µL 0.2 µL 0.6 µg Hasta 20 µL	37 °C
PCMV6-XL4-MCAM			
DIGESTIÓN 1	Tampón D 10% Not I (Promega) ADN H ₂ O	1 µL 0.2 µL 0.6 µg Hasta 20 µL	37 °C
DIGESTIÓN 2	Tp MULTI-CORE 10% Sma I (Promega) ADN H ₂ O	1 µL 0.2 µL 0.6 µg Hasta 20 µL	25 °C
DIGESTIÓN 3	Tampón D 10% Xba I (Promega) ADN H ₂ O	1 µL 0.2 µL 0.6 µg Hasta 20 µL	37 °C

Tabla 2. Reacciones de digestión empleadas para cada plásmido.

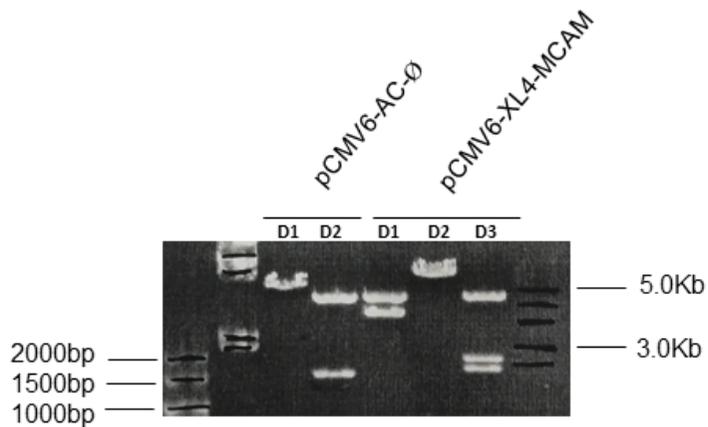


Figura 10. Representación de los fragmentos del ADN digerido de los plásmidos pCMV6-Ac-Ø y pCMV6-XL4-MCAM por gel de agarosa.

2.3.3. Transfección celular de las CMVL

La transfección celular se realiza por nucleofección con el equipo Amaxa® y con el kit “Human AoSMC Nucleofector® Kit” (Lonza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se tripsinizan las células y se centrifugan a 270 x g durante 10 minutos. El botón celular se resuspende en 200 µL de la solución de nucleofección (Nucleofector solution + supplement 4.5/1) que se reparten entre dos cubetas de nucleofección. Se añaden 5 µg del ADN plasmídico pCMV6-Ac-Ø en una cubeta y 5 µg de pCMV6-XL4-MCAM en la otra.

A continuación, las células se someten a una nucleoporación, programa U-025, tal y como lo recomienda el kit. Las células transfectadas, en función del ensayo a realizar, se siembran en placas o en frascos a una determinada densidad.

2.4. Inducción del fenotipo contráctil de las CMVL por TGF- β 1

La diferenciación de las CMVL al fenotipo contráctil se realiza mediante un tratamiento de 7 días con el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1, del inglés *Transforming growth factor- β 1*) (Recombinant Human TGF- β 1, Peprotech) a 1 y 10 ng/mL. Cuando el cultivo alcanza una confluencia de aproximadamente el 80%, se detiene el crecimiento con medio de cultivo con 1% de SFB durante 24 horas y a continuación las células se cultivan en presencia del TGF- β 1 en medio con el 1% SFB. El medio se cambia cada 3 días. Transcurridos los 7 días, se obtienen los extractos celulares para analizar la expresión de proteínas o bien, se siembran a una densidad determinada, en placas o frascos, en función del ensayo a realizar.

3. Estudio de la expresión proteica

3.1. Homogenización de tejidos

El tejido congelado se trocea en una placa de Petri con un bisturí, y una vez troceado se introduce en un microtubo de 1.5 mL. Por cada mg de tejido se añaden 20 μ l de tampón T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher Scientific) y con un homogenizador, manteniendo el tubo en hielo, se homogeniza la muestra.

A continuación se centrifuga a máxima potencia durante 5 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo. Las muestras se guardan en alícuotas de trabajo a -80 °C hasta su posterior análisis.

3.2. Homogenización de células en cultivo

Las células cultivadas a las diferentes condiciones experimentales se solubilizan con un tampón de lisis. Las células crecidas en monocapa se lavan 2 veces con PBS y seguido se lisan con un volumen de tampón de lisis que depende del área de cultivo y se solubilizan con la ayuda de un raspador. El lisado se congela a -80 °C y se descongela (en hielo) para favorecer

la lisis. Una vez descongelada la muestra se centrifuga a máxima potencia durante 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo. El precipitado, donde están las matrices y los restos celulares, se desecha.

TAMPÓN DE LISIS	CONCENTRACIÓN
Tris	200mM
EDTA	1mM
Triton-100X	0.1%
<i>Complete mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail</i>	1/6

Tabla 3. Composición del tampón de lisis empleado para la extracción de proteína.

3.3. Cuantificación de proteína

Para determinar la concentración de la proteína se utiliza el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración se calcula con una recta patrón midiendo la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

3.4. Electroforesis y Western Blot

La expresión proteica se analiza por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes con Sodio dodecil sulfato (SDS). El porcentaje de acrilamida varía entre 7.5-12% (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1), dependiendo del peso molecular de la proteína de interés. La electroforesis se realiza con el sistema de Mini-Protean II/Tetra system (Bio-Rad). Las soluciones y los tampones utilizados en esta técnica se especifican en la tabla 4.

A concentraciones equivalentes de proteína se les añade tampón de muestra y se calientan en un baño a 95 °C durante 5 minutos. Se cargan las muestras en el gel apilador y se hace migrar la electroforesis a 150 V en una cubeta con tampón de migración. El marcador de peso molecular que se utiliza es el Precision Plus Protein Dual Color Estándar (Bio Rad).

Finalizada la electroforesis, la proteína se transfiere mediante un sistema semi-húmedo (Bio-Rad) a una membrana de PVDF (Immobilion-P Transfer-Membrane 0.45 µm; Millipore),

previamente activada con metanol (MeOH). La electrotransferencia se realiza a 25 V durante 45 minutos con tampón de transferencia.

A continuación, la membrana se tiñe con una solución de *Rojo Ponceau* para comprobar que la carga de proteínas es uniforme en todas las muestras. El exceso de colorante se lava con H₂O destilada y la membrana se bloquea durante 1 hora con una solución de leche sin grasas al 5% en TBS a temperatura ambiente y agitación suave. Para la detección de las proteínas de interés, las membranas se incuban con los anticuerpos primarios (Tabla 5) diluidos en una solución de leche sin grasa al 1% en TBS o.n. a 4 °C.

Después de la incubación se realizan 2 lavados de 15 minutos con TBS-0.1% Tween-20 y 2 con leche al 1% en TBS, y se incuba la membrana con el anticuerpo secundario marcado con la peroxidasa de rábano (HRP, *hourseradish* peroxidase) durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Transcurrido este periodo de tiempo, se realizan 4 lavados de 15 minutos con TBS-0.1% Tween-20 y se revela con un sustrato quimioluminiscente (Luminata™ Forte Western HRP Substrate, Merck Millipore). La señal se detecta mediante películas autoradiográficas CURIX RP2 PLUS (AGFA) con procedimientos fotográficos estándares.

Como control de carga se utilizan los niveles de β -actina.

	REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	pH
Tampón TBS	Tris-HCl	50 mM	7.5
	NaCl	150 mM	
Tampón de migración	Tris Glicina SDS	25 mM 192 mM 1%	8.3
Tampón de transferencia	Tris Glicina MeOH	25 mM 192 mM 15%	-
Tampón de muestra	Tris-Hcl Glicerol SDS β -mercaptoetanol Azul de bromofenol	62.5 Mm 10% 2% 5% 0.0025%	-
Gel separador	Acrilamida:Bis 37,5:1 Tris-HCl pH 8.8 SDS Persulfato de amonio TEMED	7,5-12% 0.375 M 0.1% 0.05% 0.005%	
Gel apilador	Acrilamida:Bis 37,5:1 Tris-HCl pH 6.8 SDS Persulfato de amonio TEMED	4% 0.125 M 0.1% 0.05% 0.01%	-

Tabla 4. Composición de soluciones y tampones empleados para *western blot*.

ANTICUERPO 1^{ario}	REFERENCIA	DILUCIÓN
Rabbit polyclonal anti-CD146	ABCAM (Ab75769)	1/5000
TAGLN	SCBT (Sc-53932)	1/1000
CNN1	SCBT (Sc-58707)	1/1000
MTS1	SCBT (Sc-377059)	1/1000
β -actina mouse monoclonal	SIGMA-ALDRICH (A5441)	1/20000
α -actina mouse monoclonal	SIGMA-ALDRICH (A5228)	1/2500
ANTICUERPO 2^{ario}		
Polyclonal Goat Anti-rabbit Immunoglobulins/HRP	DAKO (P 0448)	1/2000
Polyclonal Rabbit anti-mouse Immunoglobulins/HRP	DAKO (P 0260)	1/2000

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para *western blot*.

4. Estudio de los niveles de ARN mensajero

4.1. Extracción de ARN de tejido

El ARN de tejido se purifica con el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), técnica basada en el método de Chomcczynski i Sacchi. Este método, mediante guanidina, urea, fenoles y cloroformo, separa el ARN en un medio acuoso dejando el ADN y las proteínas en una fase orgánica.

El tejido congelado se trocea en una placa de Petri, se introduce en un tubo que contiene la matriz Lysing matrix D (MP Biomedicals Germany GmbH, Alemania) y se añade 1 mL de Trizol. El tejido se homogeniza en un FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) durante 60 segundos.

A la muestra se añaden 200 μ l de cloroformo por mL de Trizol, se agita con el vórtex y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifuga la muestra a 20780 x g durante 10 minutos a 4 °C, y se transfiere la fase acuosa superior a otro tubo libre de ARNsas.

Al volumen extraído se le añaden 500 μ L de Isopropanol, se agita con el vortex y se incuba o.n. a -20 °C para que el ARN precipite. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 20780 x g durante 5 minutos a 4 °C, se elimina el sobrenadante, y el ARN precipitado se limpia con etanol al 75%.

Finalmente, el ARN se resuspende en 50 μ l de H₂O destilada libre de ARNsas y se guarda a -80°C hasta su posterior análisis.

La concentración del ARN se analiza con un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermo Scientific) según la absorbancia a 260 nm (1 UA=40 μ g RNA), y la pureza se determina con el cociente 260/280, que para ser óptima el valor debe estar entre 1.8 y 2.

4.2. Extracción de ARN celular

El ARN de las células en cultivo se extrae con el reactivo Trisure (BioLine) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta técnica también está basada en el método de Chomczynski.

Las células crecidas en monocapa se lisan con el Trisure (1 mL/9.6 cm²) y se pasan a un tubo libre de ARNsas. El lisado se congela para facilitar la lisis celular. En el momento de la extracción, las muestras se descongelan a temperatura ambiente y se añaden 200 µl de Cloroformo (por mL de Trisure). A partir de aquí el protocolo de extracción y cuantificación es el mismo que se emplea para el ARN de tejido, excepto que el ARN celular se resuspende en 30 µl de H₂O destilada. Finalmente, las muestras se guardan a -80 °C hasta su posterior análisis.

4.3. Transcripción reversa y PCR a tiempo real

La cuantificación relativa de los niveles del ARN mensajero de los genes de interés se analiza por RT-qPCR a tiempo real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*).

El ADN de cadena sencilla complementaria (ADNc) se sintetiza a partir de 0.5-1 µg de ARN por transcripción reversa (o retrotranscripción) utilizando el kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizan secuencias aleatorias como oligonucleótidos cebadores (*random primers*) y la transcriptasa reversa Multiscribe™. La reacción y las condiciones se especifican en las tablas 6 y 7.

REACCIÓN	VOLUMEN
BUFFER 10X	2.0 µl
dNTP's	0.8 µl
CEBADORES ALEATORIOS	2.0 µl
TRANSCRIPTASA REVERSA	1.0 µl
H ₂ O	4.2 µl
ARN	1 µg + H ₂ O hasta 10 µl
TOTAL	20 µl

Tabla 6. Reacción de la transcripción reversa.

CICLO (Tª)	TIEMPO
25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	5 min

Tabla 7. Condiciones del programa de la transcripción reversa.

El ADNc se diluye 1/10 con H₂O destilada y se almacena a -80 °C hasta su posterior análisis.

Para la amplificación del ADNc por PCR a tiempo real, se utilizan ensayos TaqMan® Gene Expression Assay y el equipo de detección ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems). Este método permite medir la amplificación de productos a tiempo real mediante un sistema de dos oligonucleótidos cebadores y una sonda específica (tabla 8) para la secuencia diana. Las sondas tienen un fluorocromo en el extremo 3' y una molécula inhibidora o *quencher*, sin fluorocromo, en el extremo 5', que por proximidad, bloquea la emisión de fluorescencia de la primera. La sonda hibrida a la parte central del amplicón, pero no emite fluorescencia hasta que la polimerasa la hidroliza. De esta manera se detecta la amplificación de un determinado producto con una elevada especificidad. La reacción y las condiciones del programa se especifican en las tablas 9 y 10.

LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	SONDA	ESPECIE	REFERENCIA
CONTROLES ENDOGENOS	β-actina	Humana	Hs99999903_m1
LAMININAS	DAG-1	Humana	Hs00189308_m1
	LAMA-2	Humana	Hs00166308_m1
	LAMA-3	Humana	Hs00165042_m1
	LAMA-4	Humana	Hs00935293_m1
	LAMA-5	Humana	Hs00966585_m1
MARCADORES MUSCULARES	CNN1	Humana	Hs00959434_m1
	MYH-11	Humana	Hs00975796_m1
	TAGLN	Humana	Hs01038777_g1
OTROS MARCADORES	S100A4	Human	Hs00243202_m1
	MCAM	Human	Hs00174838_m1

Tabla 8. Oligonucleótidos usados para las RT-PCR cuantitativas realizadas en este proyecto.

REACTIVO	VOLUMEN
MASTER MIX (2X)	5.0 μ l
SONDA (25X)	0.5 μ l
ADNc diluido	4.5 μ l
TOTAL	10 μl

Tabla 9. Reacción de la PCR a tiempo real.

CICLO (T ^ª)	TIEMPO
50 °C	2 min
95 °C	10 min
95 °C	15 seg
60 °C	1 min

Tabla 10. Condiciones del programa de la PCR a tiempo real.

5. Estudio de los niveles de sCD146 en plasma

Los niveles de sCD146 en sangre se analizan mediante un ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante (Human MCAM ELISA Kit; RayBio[®], Norcross, GA). Las muestras de plasma se diluyen 1/100 para su análisis.

Los niveles de sCD146 presentes en los medios de los secretomas y los niveles de CD146 de los extractos de tejido obtenidos como se explica en el apartado 3.1 también se cuantifican mediante este ensayo.

El ELISA se basa en la inmunoabsorción ligada a enzimas. El antígeno, la proteína de interés, presente tanto en el estándar como en las muestras, se une al anticuerpo inmovilizado. A continuación, se añade un anticuerpo de detección marcado con biotina que reconoce el complejo. Después se añade una solución de Streptavidina conjugada con HRP y una solución con sustrato colorimétrico. Tras la incubación se para la reacción y se realiza la lectura por absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm de longitud.

Para cuantificar los niveles de la proteína se extrapolan los valores de la absorbancia a la curva estándar que proporciona el kit. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína presente en cada pocillo/muestra.

6. Estudios histológicos del tejido de aorta

Los análisis histológicos se hacen en cortes consecutivos de tejido de aorta de 3 μm de grosor. En cada portaobjetos se procesan cortes de tejido control y de AAA para su comparación.

El estudio de la estructura de los tejidos y la localización de las proteínas de interés se realiza mediante 3 técnicas diferentes.

6.1. Tinciones histológicas específicas

Los cortes de tejido de los portaobjetos se desparafinan y se rehidratan con concentraciones descendientes de alcohol. A continuación, se lavan las preparaciones en H_2O destilada y se incuban secuencialmente con los reactivos específicos para cada técnica.

6.1.1. Tinción del ácido periódico

Los cortes se incuban, en orden secuencial, con la solución del ácido peryódico 0.5% durante 5 minutos, el reactivo de Schiff durante 10 minutos y con la solución de hematoxilina modificada según Gill III durante 2 minutos. Entre reactivo y reactivo se realizan lavados de agua de grifo y de H_2O destilada. Por último, las secciones se deshidratan utilizando concentraciones crecientes de alcohol, se humedecen en xileno, y se montan las preparaciones con el medio de montaje Neo-Mount[®].

6.1.2. Tinción tricómica de Masson (con azul de anilina)

Esta tinción se realiza utilizando el Kit de Tinción de Tricómica de Masson con azul de anilina (PanReac AppliChem, ITW Reagent) siguiendo las indicaciones del fabricante.

En primer lugar, los cortes se incuban con hematoxilina férrica según Weigert durante 10 minutos y ácido pícrico durante 4 minutos. Después se lavan con H₂O destilada y seguido se incuban con la solución de escarlata de Biebrich durante 4 minutos. A continuación, los cortes se incuban con ácido fosfomolibdico durante 10 minutos y azul de anilina durante 5 minutos realizando lavados de H₂O destilada entre reactivo y reactivo.

Una vez teñidos los cortes se lavan y se deshidratan. Finalmente, se humedecen en xileno y se montan con medio de montaje Eukitt[®].

6.2. Inmunohistoquímica

Los cortes se desparafinan, se rehidratan y se realiza el desenmascaramiento de antígenos a pH bajo. A continuación, se procesan en un equipo DAKO Autostainer Link 48, utilizando el Dako Envision Flex Kit, los anticuerpos de interés (tabla 11) y diaminobencidina como cromógeno.

ANTICUERPO 1 ^{ario}	REFERENCIA	DILUCIÓN
Rabbit monoclonal Anti-CD146	ABCAM (Ab75769)	1/500
Rabbit polyclonal Anti-SM22 α	CUSABIO (CSB-PA00804A0Rb)	1/200
Rabbit polyclonal Anti-S100A4	CUSABIO (CSB-PA020632HA01HU)	1/200
SM-MHC	DAKO (IR066)	Ready to use/1:1

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados para las inmunohistoquímicas de este proyecto.

Los cortes se fotografían con el microscopio Olympus BX50 y se modifican con el programa CaseViewer.

6.3. Inmunofluorescencia

Los estudios de colocalización se realizan con la inmunodetección doble fluorescente. Después de desparafinar, rehidratar y realizar el desmascaramiento de los antígenos, se bloquea la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (TBS + 0.5% triton + 3% suero de burro) para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos.

A continuación, se incuban los cortes, primero, con los dos anticuerpos primarios (tabla 12) en solución de bloqueo o.n. a 4 °C y 2 horas a temperatura ambiente, y posteriormente, con los 2 anticuerpos secundarios fluorescentes a 37 °C durante 2 horas, a oscuras. Entre las incubaciones se realizan los lavados con solución de bloqueo. Después del último lavado, para reducir la autofluorescencia, se incuban las secciones con Sudan Black B al 1% en etanol (EtOH) al 70% durante 4 minutos a temperatura ambiente.

Los núcleos se tiñen con Hoesch 33258/DAPI a una dilución 1/10000 durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para el montaje de los cubreobjetos se utiliza medio de montaje Fluoroprep. Las imágenes se captan por microscopia laser confocal con el microscopio Leica SP5 del Servicio de Microscopia del Institut de Recerca del Sant Pau.

ANTICUERPO 1^{ario}	REFERENCIA	DILUCIÓN
Rabbit monoclonal Anti-CD146	ABCAM (Ab75769)	1/500
TAGLN	SCBT (Sc-53932)	1/50
CNN1	SCBT (Sc-58707)	1/50
SM-MHC	DAKO (IR066)	Ready to use/1:1
MTS1	SCBT (Sc-377059)	1/50
ANTICUERPO 2^{ario}	REFERENCIA	DILUCIÓN
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	Life Technologies (#A-11008)	1/200
Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG-Cy3	Life Technologies (#A-11001)	1/200

Tabla 12. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunofluorescencias de este proyecto.

7. Ensayos funcionales realizados con las CMVL

7.1. Ensayo de adhesión

Para estudiar la adhesión celular las células se tiñen con el colorante catiónico lipofílico fluorescente 1,1'-Dioctadecyl-3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate 97% (Dil).

Las células transfectadas se siembran en frascos de 25 cm² para que se recuperen de la nucleoporación durante 48 horas. Transcurrido este tiempo las células se separan del soporte de cultivo mediante el reactivo Cell Dissociation Solution 1X Non-enzymatic (Sigma), para evitar que se pierda la expresión de CD146 de la superficie celular.

A continuación, las células se tiñen con Dil a 10 µg/mL diluido en medio base y se incuban (a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂) durante 50 minutos, el exceso de colorante se elimina con lavados de PBS.

Tras el último lavado, las células de cada condición se resuspenden con medio de crecimiento hasta igualar la concentración, se siembra un volumen determinado de cada condición por duplicado, en pocillos de placas de 12 y se incuban durante 30 minutos. Se descarta/aspira el medio junto con las células no adheridas, y el cultivo se lava bien con PBS, previamente atemperado a 37 °C. Las células adheridas se solubilizan con 50 µl Triton X-100. La solución celular se transfiere, por triplicado, a pocillos de una placa de 96 y se mide la fluorescencia a 590 nm de excitación y 530 nm de emisión.

7.2. Ensayo de apoptosis

Inducimos la apoptosis en las CMVL transfectadas con un cocktail de citoquinas compuesto por 800 U/mL TNF-α (Peprotech), 800 U/mL IFN-γ (Peprotech) y 50 U/mL IL1β (Peprotech).

Las células se transfectan y se siembran en frascos de 25 cm² durante 72 horas antes del tratamiento a una densidad de 11000 células/cm². Una vez transcurrido este tiempo y que las células se hayan recuperado, se tratan con el conjunto de citoquinas diluido en medio de cultivo con 1% de SFB.

Para estudiar la apoptosis celular se utiliza el kit “Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit” (eBioscience, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, y el citometro de 3 láseres MacsQuant (Milteny Biotec).

Los datos obtenidos se analizan con el mismo programa MacsQuant.

7.3. Ensayo de migración

La migración celular se estudia mediante el ensayo de herida (*Wound-healing*). Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se ha hecho una brecha o herida.

Las células se transfectan y, se siembran en frascos de 25 cm² durante 48 horas para que se recuperen de la transfección. A continuación, se separan del soporte de cultivo con el reactivo Cell Dissociation Solution 1X Non-enzymatic (Sigma). Se cuenta el número de células y se siembran a una densidad de 15000 células/cm², por duplicado en pocillos de placas de 12, para que la monocapa alcance una confluencia aproximada del 90% a las 24 horas.

A las 24 horas se realiza la “herida” arrastrando una punta de pipeta p200 con un ángulo aproximado de 30 grados por la monocapa. Inmediatamente se realiza un lavado con PBS, para eliminar los restos celulares, y se añade medio fresco de mantenimiento al 1% de SFB.

La placa se mantiene en cultivo (37 °C, 5% CO₂) y se van tomando imágenes al microscopio invertido de manera periódica hasta que se cierre la herida por completo. En las imágenes fotográficas, el área libre de células se calcula con el programa informático Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) y se determina la velocidad de migración.

7.4. Ensayo de proliferación

Para la determinación de la proliferación celular, en CMVL tratadas con TGF-β1 y CMVL transfectadas se eligió el ensayo XTT (Cell proliferation kit II, Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo utiliza la sal de tetrazolio XTT ((3, 2, 3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil-2Htetrazol hidróxido) y como catalizador el PMS (N-metilfenacina metosulfato).

El XTT se reduce por acción de enzimas celulares formando una sal de formazán soluble coloreada. La medida de formazán que se libera al medio nos permite determinar el número de células metabólicamente activas. La cantidad de formazán se determina al espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 490 nm.

CMVL incubadas en presencia de TGF- β 1 durante 7 días o CMVL transfectadas se siembran por triplicado en pocillos de placas de 96 a 2 inóculos diferentes (1 y 5×10^3 células) en medio de crecimiento. La placa se incuba (37°C , $5\% \text{CO}_2$) durante 96 horas. Cada 24 horas se realiza una medición por XTT. Para ello, se agrega a los pocillos que corresponda $50 \mu\text{L}$ de una mezcla de XTT más el catalizador. Se incuba la placa durante 4 horas a 37°C y posteriormente se realiza la lectura a 490 nm en espectrofotómetro de placa.

7.5. Comprobación de la inducción del CD146 y de la transfección en las CMVL empleadas en los ensayos funcionales

En los estudios funcionales se comprueba la inducción y la sobre-expresión de CD146 en las CMVL, tratadas con TGF- β 1 y transfectadas con el plasmido pCMV6-XL4-MCAM, empleadas.

En cada experimento realizado se siembran dos pocillos por cada condición celular en placas de 6 pocillos. La proteína se extrae al principio y al final del experimento y la comprobación de la expresión de la proteína se realiza por electroforesis y *western blot*.

En los experimentos de apoptosis también se analiza el efecto del estímulo apoptótico sobre la expresión de CD146.

8. Análisis estadístico

La distribución de los datos de los grupos a comparar se analiza con el test de normalidad *D'Agostino & Pearson omnibus*. La evaluación de la significación estadística se realiza con test no paramétricos, entre los grupos cuyos resultados no siguen una distribución normal: *Mann Whitney Rank Sum* y con test paramétricos entre los resultados que siguen una distribución normal: *t-student* pareada o no pareada.

Los resultados se representan como la media \pm el error estándar de la media (SEM), y el análisis estadístico se realiza con el programa GraphPad Prism 6. Las diferencias se consideran significativas a partir del valor $p < 0.05$.

Las correlaciones estadísticas entre diferentes grupos y variables se calculan utilizando la correlación de Pearson (*Pearson Product Moment Correlation*).

Se utiliza la regresión lineal múltiple para estudiar la asociación de los niveles plasmáticos de sCD146 con variables cuantitativas y la regresión logística múltiple para estudiar la probabilidad de la aparición de AAA en función de los niveles plasmáticos de sCD146.

La curva ROC (*Receiver operating characteristic*) se emplea para evaluar la capacidad de CD146 de distinguir entre los pacientes con AAA y, los que no tienen AAA (AN).

Los parámetros de valor continuo se analizan mediante un análisis de árbol de clasificación y regresión (CART), considerando la condición AAA como una variable dependiente. El análisis CART divide los datos continuos en segmentos lo más heterogéneos posible, según la variable dependiente.

Esta parte de la estadística se lleva a cabo empleando el programa informático SPSS. Las diferencias se consideran significativas a partir del valor $p < 0.05$.

9. Determinación del diámetro de la aorta de los pacientes con AAA

El diámetro transversal máximo del aneurisma se cuantifica mediante angio-TC con contraste endovenoso. Se realiza en las estaciones de trabajo AGFA IMPAX, versión 6.4.4.4010 y la Osirix MD, versión FDA cleared/CE IIa para el diagnóstico primario. El diámetro transversal máximo a la luz del vaso se mide con el center line a nivel infrarrenal.

IV. RESULTADOS

1. Características de los pacientes del estudio

Para realizar este trabajo se han utilizado muestras de tejido de AAA obtenidas de pacientes sometidos a cirugía abierta electiva de AAA en el Hospital de la Sta. Creu y Sant Pau. Las muestras de tejido de aortas sanas para los controles se obtuvieron de donantes multiorgánicos en el momento de la extracción de los órganos abdominales. Los plasmas de los pacientes con AAA provienen de pacientes intervenidos quirúrgicamente y fueron extraídos en el quirófano antes de la inducción de la anestesia y los plasmas de los controles sanos de donantes del banco de sangre de nuestro centro.

En la tabla 13 se muestran las principales características clínicas, demográficas y los factores de riesgo de la población del estudio.

En la población de donantes de tejidos, observamos diferencias significativas respecto a la edad, sexo, y la prevalencia de los factores de riesgo: tabaquismo, dislipemia, hipertensión crónica (HTC), enfermedad arterial periférica (EAP), isquemia miocárdica (ECI) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) que son más prevalentes en los pacientes con AAA. También se observan diferencias significativas en el consumo de antiplaquetarios y estatinas.

Hay que tener en cuenta que debido a la procedencia de los donantes parte de la información se desconoce, por lo que algunas variables pueden estar infravaloradas en este grupo e inducir un sesgo en el cálculo estadístico.

Respecto a los donantes de plasma, también existen diferencias significativas respecto a la edad, el sexo y a los factores de riesgo dislipemia, HTC, EAP, ECI y EPOC. El uso de antiplaquetarios también es significativamente más alto en los pacientes con AAA.

Estos datos coinciden con los factores de riesgo asociados al AAA: sexo, la frecuencia es mucho mayor en hombres que en mujeres, edad, son más frecuentes en personas de más de 65 años, consumo de tabaco, EAP y la HTC. Aunque, en la actualidad, no existen alternativas no invasivas para el tratamiento de esta enfermedad, el uso de fármacos (estatinas, bloqueantes de receptores beta adrenérgicos) se recomienda como tratamiento en los pacientes con AAA a fin de reducir el riesgo de complicaciones derivadas del aneurisma. Únicamente modificaciones del estilo de vida, como la reducción del consumo de tabaco, han demostrado ser eficaces reduciendo la progresión anual de la enfermedad.

	TEJIDOS			PLASMAS		
	AAA	AN	<i>p</i>	AAA	Controles	<i>p</i>
N	89	17	-	89	63	
Edad (años)	71.0±6.6	57.5±15.9	<0.001	71.7±6.7	65.9±6.29	<0.001
Mujeres	5.6	58.8	<0.001	5.6	11.1	0.045
Diámetro aórtico (mm)	64.9±13.0	-		65.0±12.1	-	
Dislipidemia	60.7	17.6	0.003	60.7	15.9	<0.001
HTC	71.9	5.9	<0.001	73.0	36.5	0.006
Diabetes	23.6	11.8	0.446	24.7	7.9	0.516
Fumadores	27.0	17.6	0.050	22.5	14.3	0.489
EAP	49.4	0.0	<0.001	49.4	0.0	<0.001
ECV	7.9	5.9	0.828	9.0	0.0	0.971
ECI	24.7	0.0	0.048	28.1	0.0	0.005
EPOC	19.1	0.0	0.108	16.9	0.0	0.017
Antiplaquetarios	59.6	11.8	<0.001	60.7	7.9	<0.001
Estatinas	68.5	5.9	<0.001	73.0	47.6	0.166
Antiinflamatorios no esteroideos	4.5	0.0	0.845	3.4	11.1	0.711
Corticoides	5.6	0.0	0.706	5.6	4.8	0.532
Inmunosupresores	4.5	0.0	0.845	4.5	1.6	0.990

Tabla 13. Datos clínicos y demográficos de la cohorte de individuos empleados en este estudio.

Las variables nominales se muestran en %, y las variables continuas como media ±SD. Debido a la procedencia de las muestras de los controles se desconocen algunos de los datos clínicos por lo que es probable que estén infravalorados. HTC, hipertensión crónica; EAP, enfermedad arterial periférica; ECV, enfermedad cerebrovascular. ECI, enfermedad de corazón isquémico; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

2. Estudio histológico de la pared aórtica en AAA y AN

2.1. Los tejidos de AAA presentan alteraciones en la estructura de la pared

La etiopatogenia de la enfermedad aneurismática es compleja y todavía hoy permanece esencialmente desconocida. Histológicamente el AAA se caracteriza por una degeneración de los elementos estructurales de la pared de la aorta y un remodelado de la media con evidencia de inflamación crónica, hipervascularización, destrucción de la lámina elástica y pérdida de las CMVL.

Para estudiar las alteraciones estructurales de la pared de la aorta en el AAA, hemos realizado tinciones histológicas específicas en muestras de tejido de AAA y AN.

El estudio histológico confirma la alteración en la estructura del tejido de AAA. Con la tinción tricómica de Masson se observa en la capa media de los tejidos de AAA una disminución del citoplasma celular y una disminución y desorganización de las fibras musculares, que se asocia a una disminución del número de CMVL (Figura 11a). La tinción negativa de ácido peryódico de Schiff (PAS) en tejidos de AAA muestra una pérdida de estructura de la MB, posiblemente debido a la disminución de polisacáridos (Figura 11b). La MB es una delgada capa de la matriz extracelular que rodea las células musculares dejando algunos espacios que permiten a las células musculares contiguas formar uniones en hendidura. Sus principales funciones son dar soporte físico y actuar como barrera con una permeabilidad selectiva, así como regular las actividades biológicas.

En las muestras de tejido de aneurisma, también se observa un infiltrado inflamatorio focal, predominantemente en la adventicia, con tendencia en algunos casos a formar nódulos y la presencia de trombos.

Estas alteraciones estructurales en el tejido de AAA se pueden asociar al remodelado de la media que contribuye al debilitamiento de la pared vascular y progresión de la enfermedad.

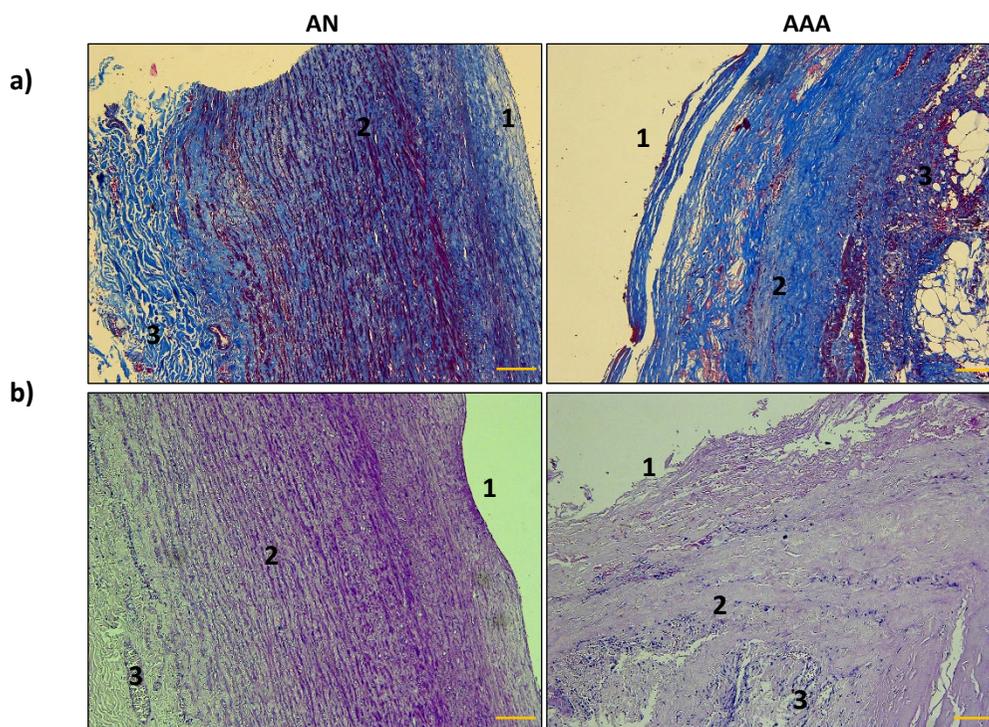


Figura 11. Imágenes representativas de tinciones histológicas de tejido de AAA y AN. a) Tinción tricómica de Masson: tinción del tejido conjuntivo, colágeno (azul), núcleos (lila-marrón) y citoplasma, glóbulos rojos y fibras musculares (rojo). **b)** Tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS): Tinción de la cromatina, núcleos (azul oscuro) y polisacáridos (proteoglicanos y glucoproteínas), que componen la membrana basal (MB), de color magenta (rojo-púrpura). Los números representan las tres capas/túnicas que componen el tejido: 1-íntima, 2-media y 3-adventicia. La escala es de 100 μ m; AAA, n=4; AN, n=4.

2.2. Los niveles de expresión de ARN mensajero de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas y del receptor DAG-1 están diferencialmente expresados en los tejidos de AAA y AN

En el estudio histológico observamos que existen diferencias estructurales entre los tejidos de AAA y de AN, parcialmente debidas a cambios en la membrana basal. Para determinar si este cambio estructural va asociado a la variación en la composición de ésta, analizamos la

expresión a nivel transcripcional de las cadenas α de las lamininas y del receptor DAG-1 por PCR a tiempo real.

Las lamininas son uno de los principales componentes de la MB que proporcionan sitios de unión a través de sus cadenas α , promueven la adhesión y migración celular y regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. El receptor DAG-1, actúa como receptor de las lamininas participando en la unión del citoesqueleto y los componentes de la ME.

El análisis por PCR muestra que los niveles de expresión de ARNm de las cadenas α -2,-3 y -4 de las lamininas y de DAG-1 están incrementados significativamente en el tejido de AAA respecto al tejido de AN ($p=0.005$, $p<0.0001$, $p=0.0003$ y $p=0.028$, respectivamente), mientras que los niveles de expresión de ARNm de la cadena α -5 de la laminina están disminuidos ($p=0.012$) (Figura 12).

Las isoformas de laminina muestran un patrón de distribución específica de tejido y son esenciales para el correcto desarrollo tisular, por lo que el estudio de la composición de lamininas en tejido podría permitir establecer las bases moleculares de numerosas patologías. La expresión diferencial de las lamininas en el tejido de AAA que observamos en estos resultados representa un cambio en la estructura y función de la MB.

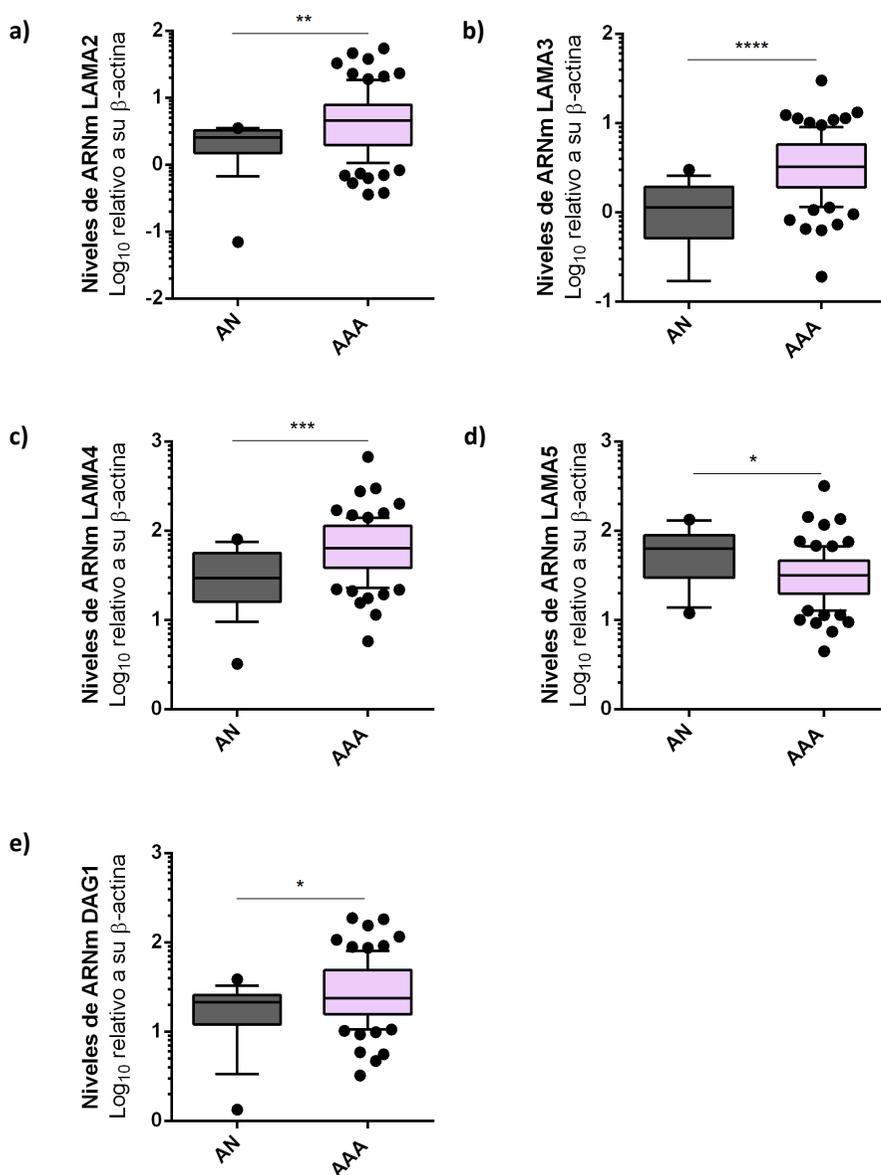


Figura 12. Niveles de expresión de ARNm de las cadenas α de las lamininas y del receptor DAG-1 en tejidos de AAA y AN. Los niveles de ARNm de la cadena α -2 (a), -3 (b), -4 (c) y -5 (d) de la laminina y del receptor DAG-1 (e) en tejidos de AAA (n=88) y de AN (n=17) se analizan por RT-qPCR. Las cajas indican los percentiles 25 y 75%, y la línea horizontal, la mediana. Los puntos representan los valores que se encuentran fuera de los percentiles 10 y 90%. Los datos se comparan con la prueba *Mann Whitney*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3. Estudio de la expresión de CD146 en tejidos de AAA y AN

3.1. La expresión de CD146 está disminuida en el tejido de AAA, y esta disminución está asociada a la disminución de su expresión en las CMVL de la capa media

El CD146 tiene un papel importante en la estructura del vaso, así como en la angiogénesis e inflamación. Los niveles de CD146 se han asociado a la presencia de enfermedad cardiovascular, relacionado con los mecanismos de inflamación crónica y disregulación inmunitaria presentes en estas enfermedades que conducen a daño endotelial y fallo de la reparación vascular. El CD146 actúa como receptor para las lamininas compuestas por la cadena α -4 y está asociado con la reorganización del citoesqueleto de actina. Forma parte de la unión de las células de la pared del vaso sanguíneo, endoteliales vasculares, musculares lisas y pericitos, a la membrana basal. Dado que hemos observado diferencias en la composición de la MB, nos planteamos el estudio de la expresión y actividad del CD146 en el AAA.

Para estudiar la expresión del CD146 en tejidos de AAA, analizamos los niveles de expresión de CD146 a nivel transcripcional, por PCR a tiempo real, y de proteína, por *western blot* y ELISA, en tejidos de AAA y AN.

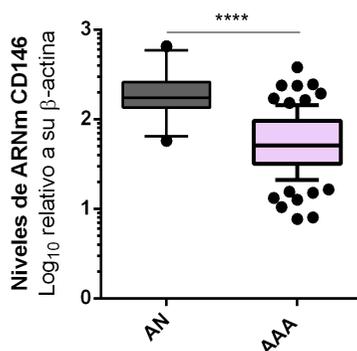


Figura 13. Niveles de expresión de ARNm de CD146 en tejidos de AAA y AN. Los niveles de ARNm de CD146 en tejidos de AAA (n=88) y de AN (n=17) se analizan por RT-qPCR. Las cajas indican los percentiles 25 y 75%, y la línea horizontal la mediana. Los puntos representan los valores que se encuentran fuera de los percentiles 10 y 90%. Los datos se comparan con la prueba de *Mann Whitney*. ****p<0.0001.

Observamos que los niveles de expresión de ARNm de CD146 en tejidos de AAA son significativamente más bajos que los niveles en tejidos de AN ($p < 0.0001$) (Figura 13). Los resultados de *western blot* (Figura 14a) y ELISA (Figura 14b) de lisados de tejido de AAA y AN muestran que la disminución de los niveles de ARNm se correlaciona con una disminución a nivel de proteína, siendo la diferencia de los niveles de CD146 cuantificados por ELISA estadísticamente significativa (AAA 0.023 ± 0.003 ng/mL, AN 0.135 ± 0.036 ng/mL; $p < 0.0001$).

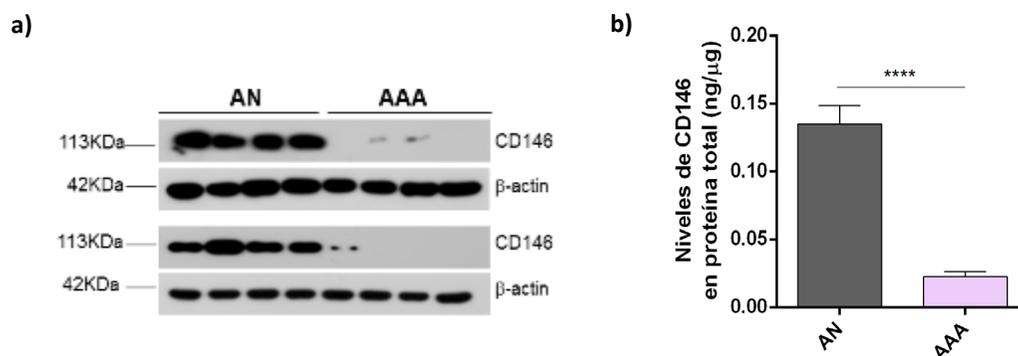


Figura 14. Niveles de expresión de proteína CD146 en tejidos de AAA y AN. a) *Western blot* representativos de CD146 y β -actina como control endógeno en lisados de tejido de AAA (n=12) y AN (n=12). b) Los niveles de CD146 (ng/ μ g proteína) en lisados de tejidos de AAA (n=12) y AN (n=12) se analizan por ELISA. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM). Los datos se comparan con la prueba *t-student* no pareada. **** $p < 0.0001$.

La diferencia de los niveles de expresión de CD146 entre los tejidos de AAA y AN nos indujo a determinar el patrón de expresión de esta proteína en el tejido aórtico mediante inmunohistoquímica.

En los tejidos de AN observamos que el CD146 se expresa en las CMVL de la media y en las células endoteliales de la microvasculatura de la adventicia (figura 15). En los tejidos de AAA en cambio, observamos una disminución de la inmunotinción de CD146 en las CMVL de la capa media (Figura 15a), mientras que las células endoteliales sí expresan CD146 como en el caso de la AN (Figura 15b).

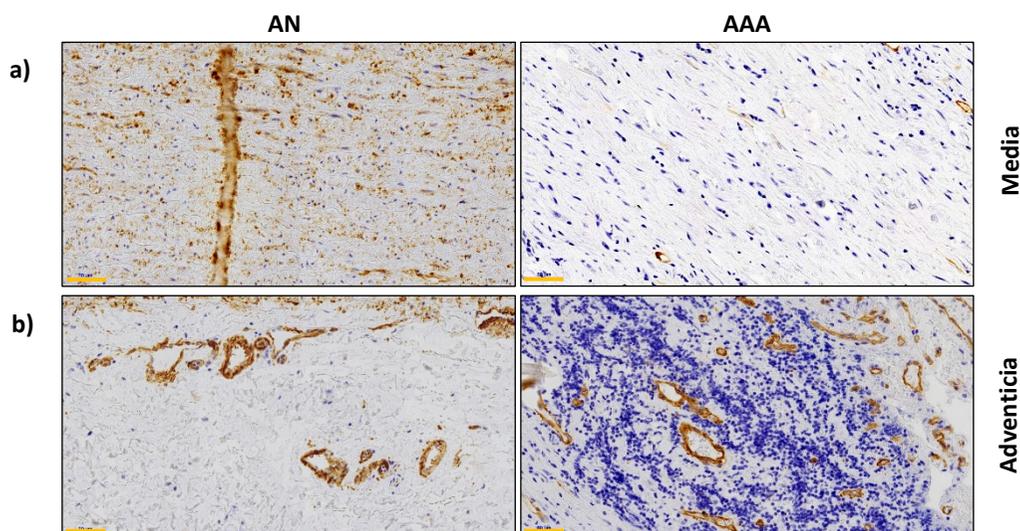


Figura 15. Expresión inmunohistoquímica de CD146 en tejido de AAA y AN. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de CD146 en tejidos de AAA y AN. Se muestra en detalle la tinción de las CMVL de la capa media **(a)** y de las células endoteliales de la microvasculatura de la capa adventicia **(b)** en tejidos de AN y AAA. La escala es de 50 μ m. AAA (n=6); AN (n=6).

Estos resultados indican que el CD146 se expresa fundamentalmente en las células vasculares, CMVL y microendoteliales. La disminución de la expresión de CD146 observada en el tejido de AAA está asociada a las CMVL. Esta disminución no es debida únicamente a la pérdida de CMVL en la capa media de la aorta aneurismática, sino también a la disminución de su expresión en las CMVL de la capa media.

4. Caracterización del fenotipo de los cultivos primarios de CMVL

Las diferencias que hemos observado en la expresión de CD146 en las CMVL de la pared de la aorta de AAA hacen que nos planteemos estudiar su expresión en las CMVL de aortas humanas en cultivo.

La CMVL adulta conserva una elevada plasticidad fenotípica que permite su fácil desdiferenciación hacia un amplio espectro de fenotipos como respuesta adaptativa a diferentes estímulos fisiológicos o patológicos. Esta modulación fenotípica permite a las

CMVL jugar un papel clave en la fisiopatología de las enfermedades vasculares. Por otro lado, se ha asociado la expresión de CD146 con el potencial de diferenciación de distintos tipos celulares, entre ellos el fenotipo diferenciado de las CMVL (175).

Los cultivos *in vitro* de CMVL procedentes de arterias humanas o animales obtenidos mediante la técnica de explante, presentan el fenotipo desdiferenciado o sintético y proliferan. Presentan características asociadas al fenotipo sintético observado *in vivo*, entre ellas: la pérdida de la contractilidad, la represión de los genes de las proteínas marcadoras del fenotipo contráctil (marcadores musculares) y el aumento de migración, tasa de proliferación y secreción de los componentes de la ME y MMP (4) (211).

Un gran número de factores como factores de crecimiento, mediadores inflamatorios, componentes de la matriz e interacciones entre células, regulan la modulación del fenotipo de las CMVL. Entre ellos el factor de crecimiento transformante (TGF- β , del inglés *Transforming growth factor*) se ha descrito como uno de los factores más potentes induciendo la diferenciación de las CMVL (211).

4.1. La inducción del fenotipo contráctil por TGF- β 1 se asocia con la inducción de la expresión de CD146 en las CMVL en cultivo

Con la finalidad de analizar la relación de la expresión de CD146 con el cambio de fenotipo de las CMVL, tratamos cultivos primarios de CMVL de aorta abdominal de controles sanos con TGF- β 1 durante 7 días para inducir el fenotipo contráctil. Analizamos la expresión de CD146, de las proteínas relacionadas con el fenotipo contráctil (SM-MHC, Calponina-1, y TAGLN) y con el fenotipo desdiferenciado (S100A4). También analizamos la expresión del receptor DAG-1 y de las cadenas α de las lamininas, así como características funcionales relacionadas con el fenotipo de las CMVL.

En primer lugar, por *western blot* observamos que los cultivos primarios de CMVL obtenidos mediante la técnica de explante no expresan la proteína CD146 (figura 16).

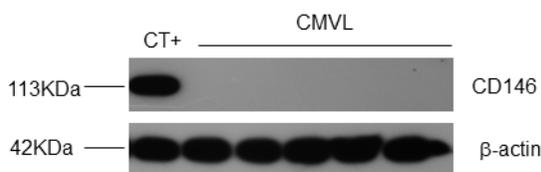


Figura 16. Niveles de expresión de proteína CD146 en las CMVL en cultivo. *Western blot* representativo de la expresión de CD146 y de β -actina como control endógeno en 5 líneas independientes de CMVL. Como control positivo utilizamos células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC).

Para determinar la concentración de TGF- β 1 a la que se induce la diferenciación celular y si el TGF- β 1 regula la expresión de CD146, tratamos las CMVL con 1 y 10 ng/mL de TGF- β 1 durante 7 días y analizamos la expresión de CD146 y TAGLN, como marcador de fenotipo, por *western blot*.

Observamos que a las concentraciones analizadas el TGF- β 1 induce la expresión de la proteína CD146, siendo la respuesta dependiente de la dosis, y de TAGLN, cuya expresión ya es máxima a la concentración de 1 ng/mL (Figura 17). Al microscopio observamos que los cultivos de CMVL tratados con TGF- β 1 cambian de morfología respecto a los no tratados, adquiriendo la forma de huso (*splinde shaped morphology*), característica del fenotipo contráctil (4) (Figura 18). Decidimos utilizar la concentración de 10 ng/mL en los siguientes experimentos para garantizar la máxima expresión de CD146.

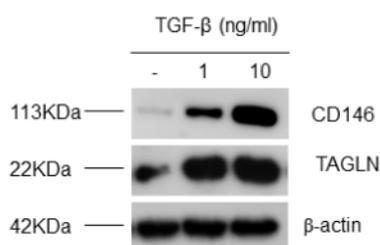


Figura 17. Expresión de CD146 y TAGLN en CMVL tratadas con distintas concentraciones de TGF- β 1 en cultivo. *Western blot* representativo de la expresión de proteína CD146, TAGLN y β -actina, como control endógeno, en CMVL cultivadas en presencia de 1 y 10 ng/mL de TGF- β 1 y CMVL control durante 7 días.

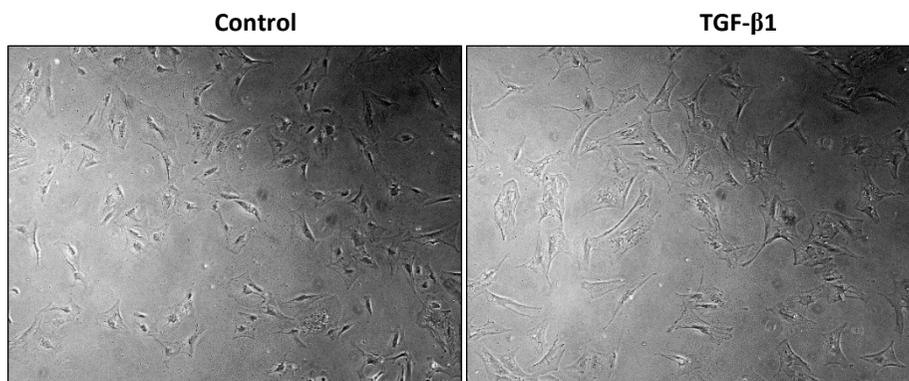


Figura 18. Efecto del TGF- β 1 sobre la morfología celular de las CMVL en cultivo. Imágenes representativas de CMVL tratadas con TGF- β 1 a 10 ng/mL y CMVL control en cultivo, obtenidas al microscopio de contraste de fases.

Los niveles de expresión de ARNm de SM-MHC, TAGLN, Calponina-1 y CD146 se incrementan con el tratamiento con TGF- β 1 aunque las diferencias no son significativas. Sin embargo, los niveles de expresión de S100A4 son significativamente inferiores en CMVL tratadas respecto a las no tratadas ($p=0.047$) (Figura 19b), así como los del DAG-1 y las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas, siendo la diferencia estadísticamente significativa para el DAG-1 ($p=0.036$), laminina α -2 ($p=0.029$) y laminina α -4 ($p=0.015$) (Figura 19a).

El análisis de la expresión de las proteínas marcadoras del fenotipo contráctil TAGLN y Calponina-1, CD146 y el marcador de desdiferenciación S100A4 por *western blot* correlacionan con los resultados de ARNm (Figura 19c).

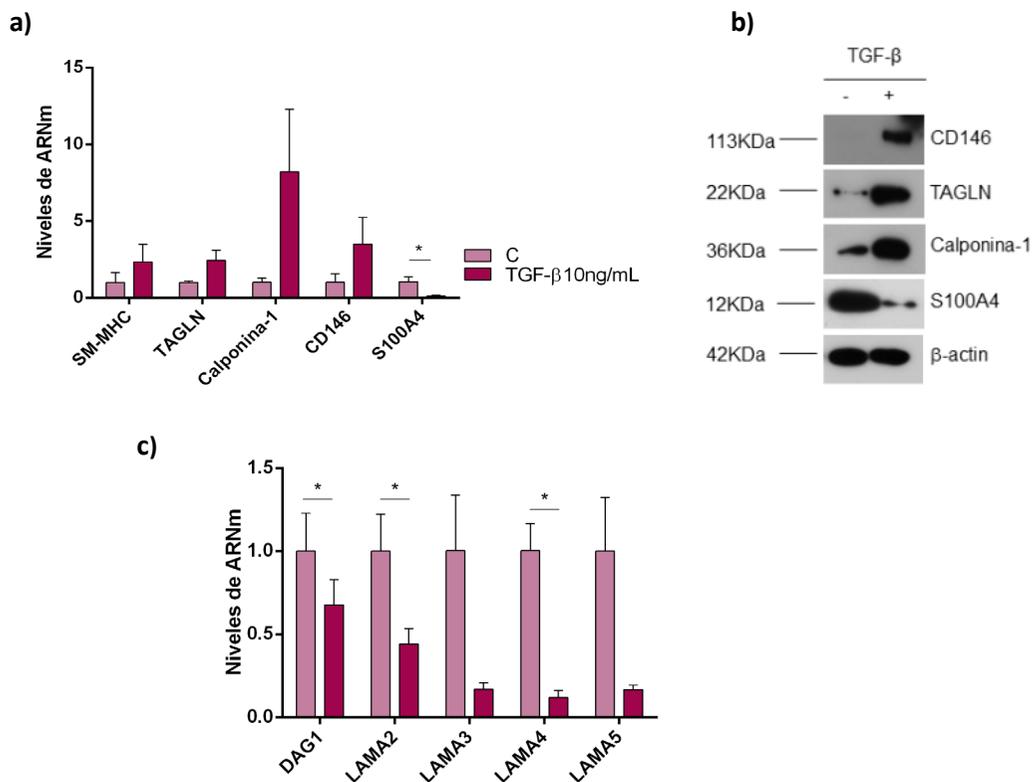


Figura 19. Niveles de expresión de los marcadores del fenotipo contráctil de las CMVL, CD146, S100A4, del receptor DAG-1 y las cadenas α de las lamininas en CMVL tratadas con TGF- β 1 10ng/mL y las CMVL control en cultivo. CMVL en placas de p6 se incuban en presencia y ausencia de 10 ng/mL de TGF- β 1 durante 7 días, transcurridos los cuales se analizan los niveles de ARN por RT-qPCR y de proteína por *western blot*. **a)** Niveles de ARNm de los marcadores del fenotipo contráctil (SM-MHC, TAGLN, Calponina-1), CD146 y S100A4. **b)** *Western blot* representativo de CD146, TAGLN, Calponina-1, S100A4, y β -actina como control endógeno de las CMVL tratadas con TGF- β 1 a 10ng/mL y las CMVL control en cultivo (n=4). **c)** Niveles de ARNm del receptor DAG-1 y de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 4 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada. *p<0.05.

Dado que la proliferación es una característica que depende del fenotipo de las CMVL, estudiamos si existen diferencias en la capacidad proliferativa de las CMVL tratadas y no tratadas con TGF- β 1 utilizando el ensayo XTT.

Aunque con el inóculo de 1×10^3 no se alcanzan niveles notables de proliferación y no se observan diferencias entre ambas condiciones (incremento de absorbancia a 490 nm a las 72 horas C: 0.481 ± 0.172 ; TGF- β -1: 0.240 ± 0.066 , $p=0.409$), con el inóculo de 5×10^3 observamos que la capacidad de proliferar es menor en las CMVL tratadas con TGF- β 1 aunque la diferencia no es significativa (incremento de absorbancia a las 72 horas C: 1.149 ± 0.073 ; TGF- β 1: 0.799 ± 0.170 , $p=0.275$) (Figura 20).

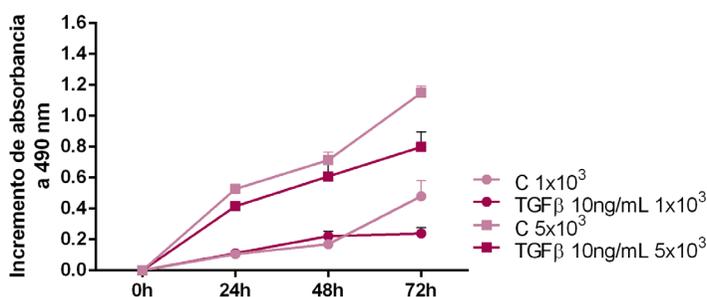


Figura 20. Cinética de tiempo de la proliferación de CMVL tratadas con TGF- β 1 a 10 ng/mL y CMVL control en cultivo. CMVL se cultivan en frascos de 75 cm^2 en presencia y ausencia de TGF- β 1 a 10 ng/mL durante 7 días. Transcurrido este tiempo se siembran a 2 inóculos diferentes, 1×10^3 y 5×10^3 , en placas de p96 por duplicado. A distintos tiempos se añade XTT y se incuban 4 horas. El incremento de absorbancia se calcula restando a cada tiempo el valor de absorbancia de su tiempo 0. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 3 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada.

En conclusión, la inducción de los marcadores de fenotipo contráctil, tanto a nivel de ARNm como de proteína, el cambio de la morfología celular y la inhibición de la tasa de proliferación son consistentes con que el tratamiento con TGF- β 1 induce la diferenciación de las CMVL al fenotipo contráctil.

El fenotipo contráctil de las CMVL inducido por TGF- β 1 a su vez, se correlaciona con una disminución de la expresión del marcador de las CMVL desdiferenciadas S100A4, a nivel de ARNm y proteína, y de los niveles de expresión de ARNm de DAG-1, y de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas.

Asimismo, estos resultados demuestran que la expresión de CD146 en los cultivos de CMVL se correlaciona con el fenotipo, expresándose en las células de fenotipo contráctil.

5. Caracterización del fenotipo de las CMVL en el tejido de AAA y AN

5.1. Las CMVL del tejido de AAA presentan un fenotipo desdiferenciado o sintético

Tras demostrar que la expresión de CD146 se asocia al fenotipo contráctil de las CMVL, evaluamos si en el AAA se produce un cambio de fenotipo de las CMVL, y si la expresión diferencial de CD146 que observamos entre el tejido de AAA y AN está asociado a este cambio fenotípico. Para ello, analizamos la expresión de las proteínas del fenotipo contráctil SM-MHC, Calponina-1 y TAGLN, y del marcador de las CMVL desdiferenciadas, S100A4, en tejidos de AAA y AN a nivel de ARNm, por PCR a tiempo real, y de proteína, por *western blot*.

Observamos que los niveles de expresión de ARNm de la Calponina-1, TAGLN y SM-MHC están significativamente disminuidos en los tejidos de AAA en comparación con los de AN ($p < 0.0001$) (Figura 21 a-c). Por *western blot* analizamos la expresión de las proteínas Calponina-1 y TAGLN que, al igual que los niveles de ARNm, se encuentra disminuida (Figura 21e).

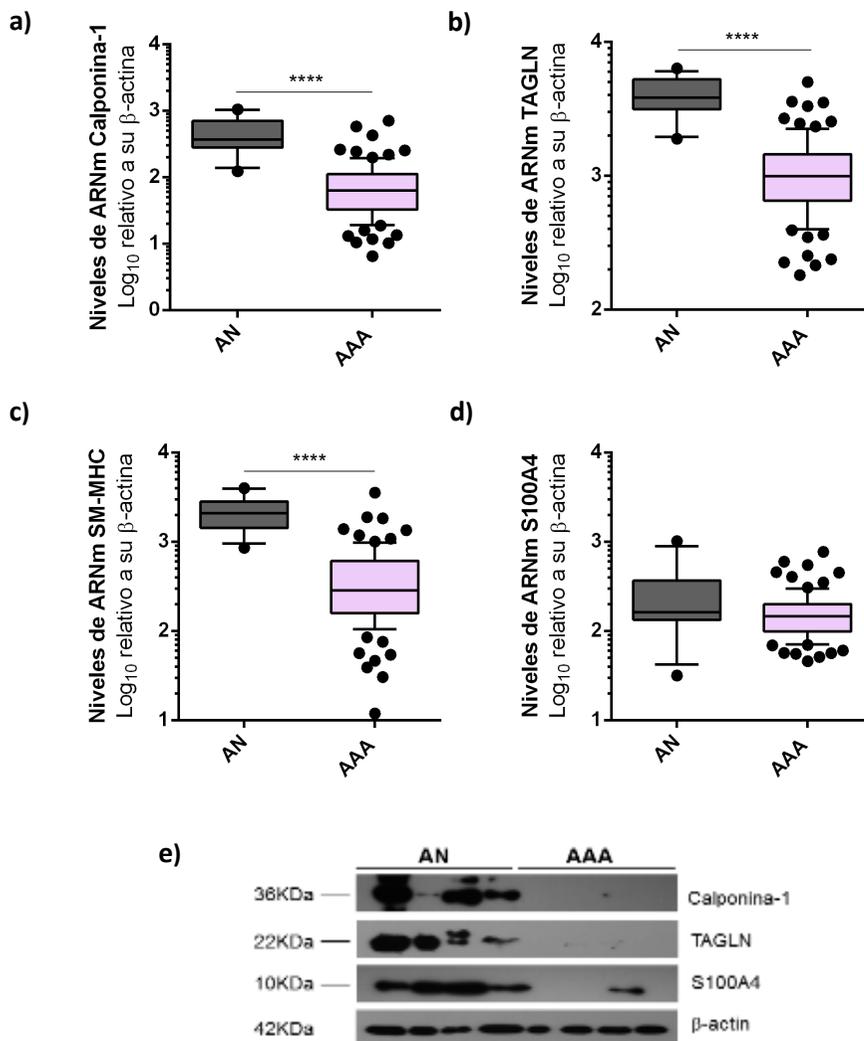


Figura 21. Niveles de expresión de los marcadores del fenotipo contráctil y de S100A4 en tejidos de AAA y AN. Los niveles de ARNm de Calponina-1, TAGLN, SM-MHC, y S100A4 (a-d) en tejidos de AAA (n=88) y de AN (n=17) se analizan por RT-qPCR. Las cajas indican los percentiles 25 y 75%, y la línea horizontal la mediana. Los puntos representan los valores que se encuentran fuera de los percentiles 10 y 90%. Los datos se comparan con la prueba *Mann Whitney*. ****p<0.0001. e) *Western blot* representativo de las proteínas Calponina-1, TAGLN, S100A4, y β-actina como control endógeno en lisados de tejido de AAA (n=12) y AN (n=12).

Por el contrario, no se observan diferencias en los niveles de ARNm del S100A4 entre los tejidos de AAA y AN (figura 21d) y por *western blot* observamos que la expresión de proteína se encuentra disminuida en la aorta de AAA (Figura 21e).

Los factores que podrían estar afectando los niveles de expresión de estas proteínas en el tejido de AAA son la disminución del número de CMVL de la capa media, debido a la apoptosis que se produce durante la progresión de la patología o bien, al cambio de fenotipo de contráctil a sintético, o lo que es lo mismo, a la desdiferenciación de las CMVL.

Para responder a esta pregunta, analizamos la expresión de estas proteínas mediante inmunohistoquímica en tejidos de AAA y AN.

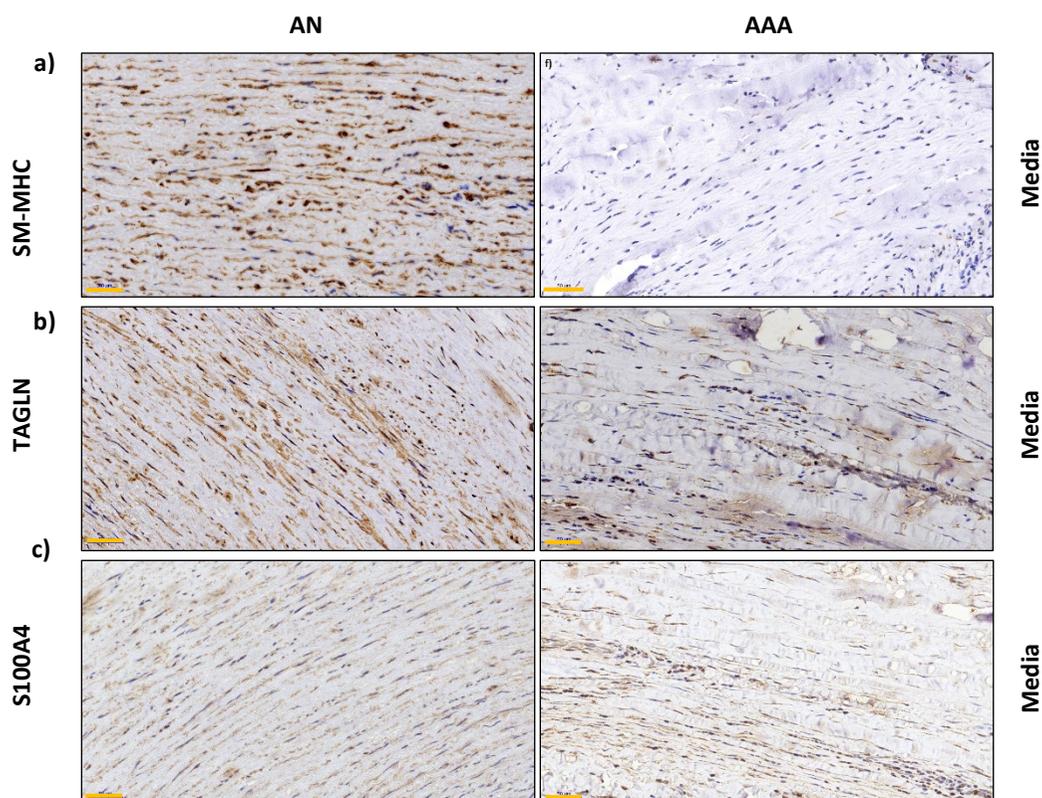


Figura 22. Expresión inmunohistoquímica de los marcadores del fenotipo contráctil SM-MHC y TAGLN y de S100A4 en tejido de AAA y AN. Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de SM-MHC (a), de TAGLN (b) y de S100A4 (c) en la capa media de los tejidos de AN y AAA. La escala es de 50μm. AAA (n=4); AN (n=4).

Observamos que la tinción de SM-MHC y de TAGLN es más débil o ausente en las CMVL de la capa media de los tejidos de AAA que en las CMVL del tejido de AN (Figura 22a y b), mientras que la tinción de S100A4 en las CMVL de la media del tejido patológico es más intensa que en el tejido normal (Figura 22c).

Aunque el número de CMVL está disminuido en la media de los tejidos patológicos, la expresión diferencial de los marcadores del fenotipo diferenciado observada entre los tejidos de AAA y AN, no es debida únicamente a esta disminución, sino que está causada, fundamentalmente, por el cambio en la expresión de estas proteínas en las CMVL. Por lo tanto, la disminución de la expresión de SM-MHC y de TAGLN que observamos en el tejido de AAA indica una desdiferenciación de las CMVL asociada a la patología donde las CMVL cambian del fenotipo contráctil de la arteria sana al no-contráctil o sintético de la aorta patológica.

La expresión de S100A4 corrobora que las CMVL del tejido patológico están desdiferenciadas. En este caso, el hecho de que el número de CMVL sea inferior en los tejidos de AAA podría explicar porque no observamos una disminución significativa a nivel de ARNm y porque por *western blot* la expresión de proteína aparece disminuida.

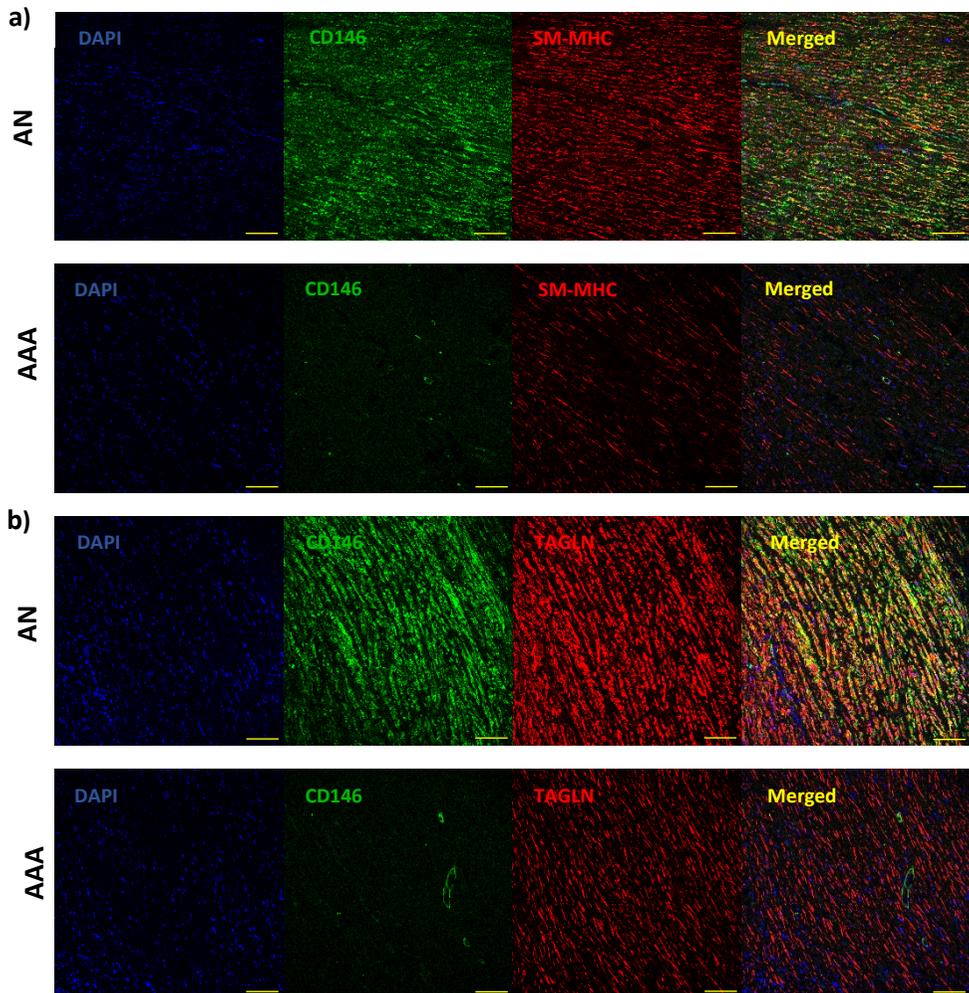
5.2. La expresión de CD146 en las CMVL de la capa media del tejido de AAA correlaciona con el fenotipo desdiferenciado de las CMVL

Una vez confirmado que las CMVL de la capa media del tejido de AAA están desdiferenciadas, es decir, que cambian de fenotipo contráctil a sintético, comprobamos si la expresión de CD146 está asociada a dicho cambio.

Mediante doble tinción por inmunofluorescencia analizamos la expresión de CD146 en el tejido con la expresión de cada uno de los marcadores fenotípicos de las CMVL de forma simultánea.

Como hemos descrito en el apartado 3.1 en el tejido AN la expresión de CD146 está localizada en las células endoteliales de la microvasculatura y en las CMVL de la capa media. Mediante la doble tinción por inmunofluorescencia observamos que el CD146 colocaliza con los marcadores del fenotipo diferenciado SM-MHC, TAGLN, y Calponina-1 (Figura 23a-c). En el tejido de AAA, a pesar de la baja intensidad de la tinción del CD146 observamos el mismo resultado. Sin embargo, el patrón de expresión del S100A4 es diferente al de CD146, ambas proteínas colocalizan en las CMVL en la AN y en el AAA. En el AAA, que como hemos mencionado la tinción de S100A4 es más intensa, además de en las CMVL se expresa en una parte de las células del infiltrado inflamatorio (Figura 23d).

Por lo tanto, los resultados de la doble tinción por inmunofluorescencia confirman que la expresión de CD146 en las CMVL del tejido de AAA se correlaciona con el fenotipo desdiferenciado.



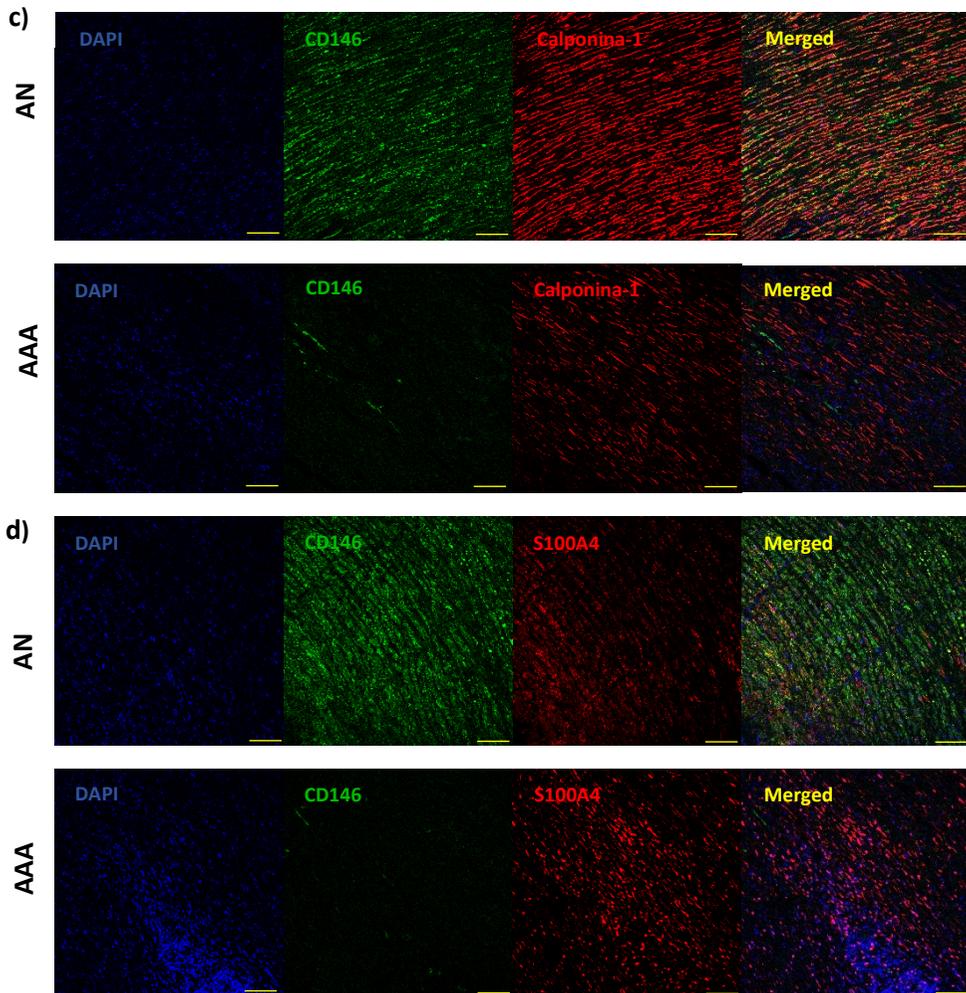


Figura 23. Imágenes representativas de tinciones de doble inmunofluorescencia de tejido de AAA y AN. Doble tinción inmunohistoquímica de CD146 y SM-MHC (a), TAGLN (b), Calponina-1 (c) y S100A4 (d), en tejidos de AAA y AN. Los núcleos se tiñen con DAPI. La colocalización de ambos marcajes se demuestra por la fluorescencia amarilla. La escala es de 50 μ m. AAA (n=3); AN (n=3).

6. Caracterización del papel del CD146 en el AAA

El estudio de las características fenotípicas de los cultivos primarios de CMVL y su regulación por el TGF- β 1, nos ha permitido determinar que las CMVL en cultivo se encuentran desdiferenciadas y no expresan CD146. Asimismo, hemos demostrado que las CMVL de la capa media del tejido de AAA presentan un fenotipo desdiferenciado asociado con la pérdida de la expresión de CD146.

A la vista de estos resultados, nos propusimos determinar si el CD146 juega un papel en los cambios funcionales de las CMVL en la patología aneurismática. Para ello, mediante transfección transitoria, generamos cultivos de CMVL que sobreexpresan CD146 y estudiamos si la expresión de CD146 modifica características morfológicas y funcionales de las CMVL en cultivo.

Transfectamos las CMVL con el plásmido pCMV6-Ac- \emptyset (control) o con el plásmido pCMV6-XL4-MCAM (CD146), y analizamos los niveles de expresión del ARNm de CD146, por RT-qPCR, y de proteína, por *western blot*, a distintos tiempos (figura 24). La expresión de ARNm y proteína se observa ya a las 24 horas después de la transfección. Los niveles de ARNm empiezan a disminuir a las 48 horas y la expresión de proteína se mantiene hasta las 96 horas (tiempo máximo analizado) aunque a este tiempo se empieza a observar una disminución.

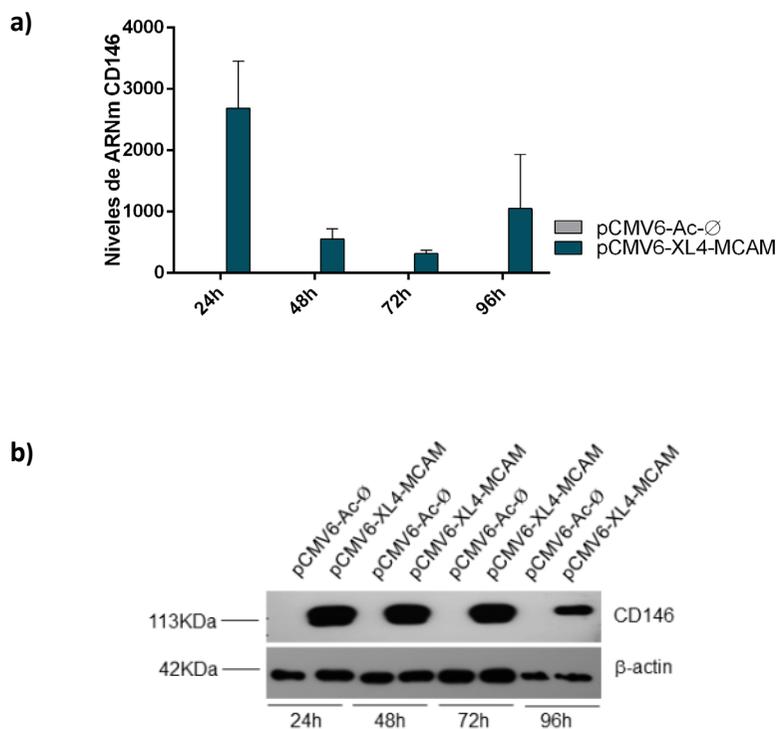


Figura 24. Cinética de tiempo de los niveles de expresión de CD146 en las CMVL transfectadas con pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM en cultivo. Las CMVL se transfectan con los plásmidos pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM y se siembran en placas de p6. Cada 24 horas se recogen extractos celulares y se analizan los niveles de ARNm por RT-qPCR y de proteína por *western blot*. **a)** Niveles del ARNm de CD146. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 3 experimentos independientes. **b)** *Western blot* representativo de CD146 y β -actina, como control endógeno (n=3).

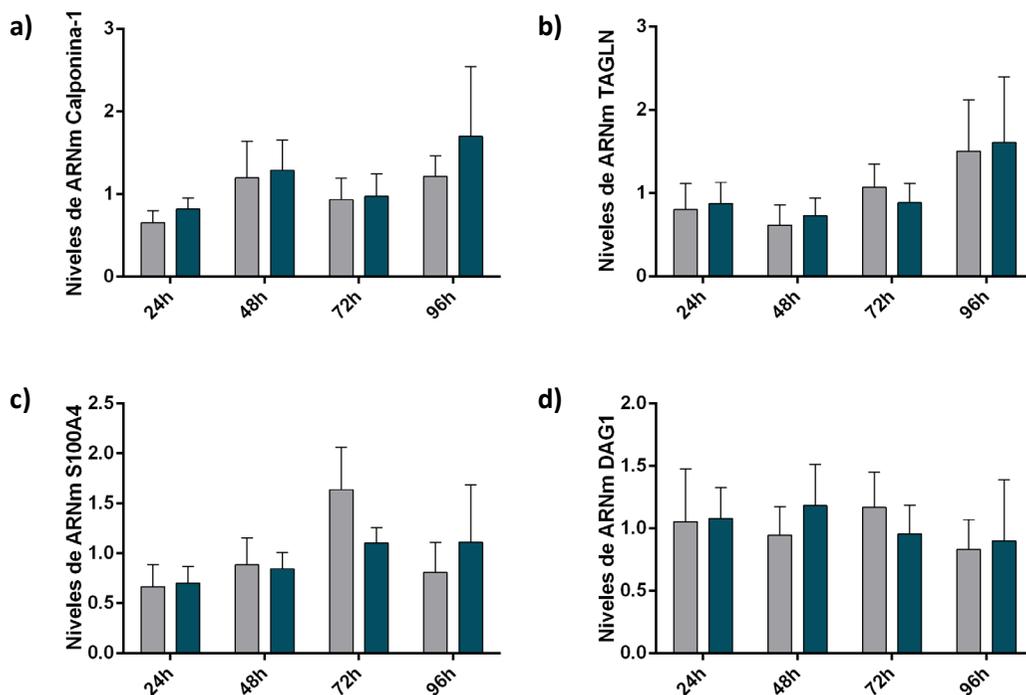
6.1. La sobreexpresión de CD146 no modifica el fenotipo de las CMVL en cultivo

Con los resultados obtenidos nos planteamos utilizar los cultivos de CMVL transfectadas para determinar si el CD146 juega algún papel en la regulación del fenotipo de las CMVL.

Para ello, analizamos los niveles de expresión de ARNm de los genes de las proteínas marcadoras del fenotipo contráctil (Calponina-1 y TAGLN), y del marcador de las CMVL desdiferenciadas, S100A4, en cultivos de CMVL que sobreexpresan CD146 y CMVL control por RT-qPCR.

También analizamos los niveles de expresión de ARNm de receptor DAG-1 y de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas ya que observamos que la diferenciación de las CMVL con TGF- β 1 produce una disminución de los mismos.

No observamos diferencias estadísticamente significativas entre las células control y las que sobreexpresan CD146 en ninguno de los ARNm analizados (Figura 25). Estos resultados sugieren que la expresión de CD146 no está implicada en los mecanismos que controlan la regulación génica del fenotipo en las CMVL en cultivo.



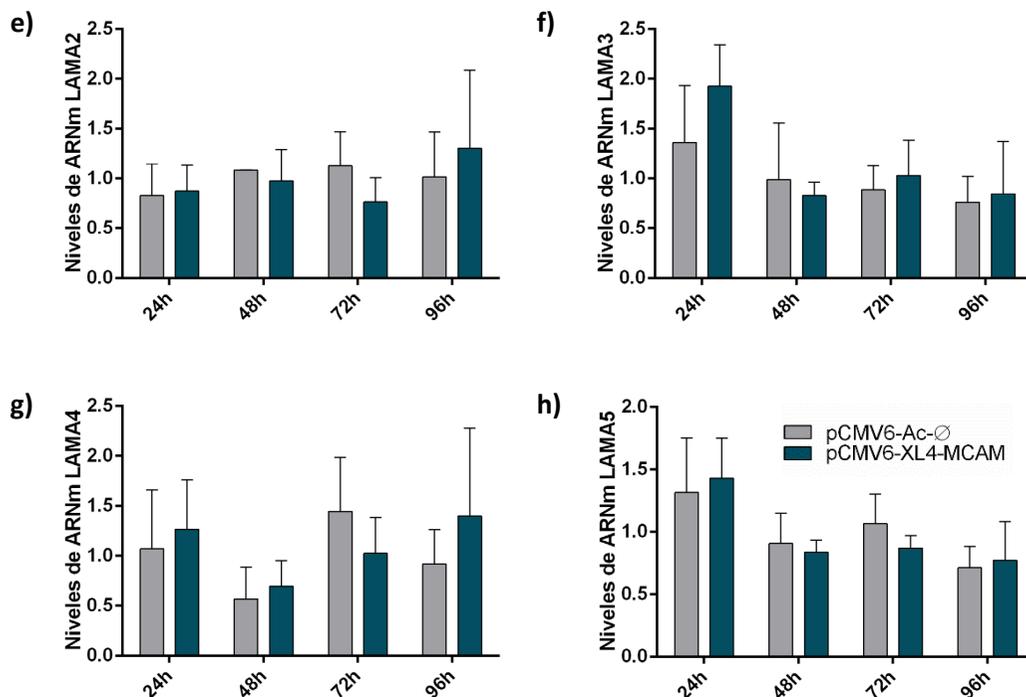


Figura 25. Cinética de tiempo de los niveles de expresión de los genes marcadores del fenotipo contráctil Calponina-1 y TAGLN, de S100A4, del receptor DAG-1 y de las cadenas α -2, -3, -4, y -5 de las lamininas en las CMVL transfectadas con pCMV6-Ac- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM en cultivo. Las CMVL se transfectan con los plásmidos pCMV6- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM y se siembran en placas de p6 y los niveles del ARNm se analizan por RT-qPCR a diferentes periodos de tiempo. Niveles del ARNm de Calponina-1 (a), TAGLN (b), S100A4 (c), del receptor DAG-1 (d) y de las cadenas α -2 (e), -3 (f), -4 (g) y -5 (h) de las lamininas. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 3 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada.

6.2. La sobreexpresión de CD146 aumenta la capacidad de adhesión de las CMVL en cultivo

La función principal de las CMVL de las arterias elásticas como la aorta, además de producir movimientos contráctiles, es mantener la resistencia vascular, función que realizan mediante la adhesión célula-célula y la adhesión a la ME mediante receptores como el

CD146. Por ello, estudiamos si el CD146 juega un papel en la adhesión de las CMVL comparando la adhesión a la superficie de cultivo de CMVL que sobreexpresan CD146 y controles.

Observamos que la sobreexpresión de CD146 incrementa el número de células adheridas al sustrato respecto a las células control (pCMV6-XL4-MCAM: 35437 ± 2054 ; pCMV6-Ac- \emptyset : 27696 ± 3094 , $p=0.0078$ (Figura 26).

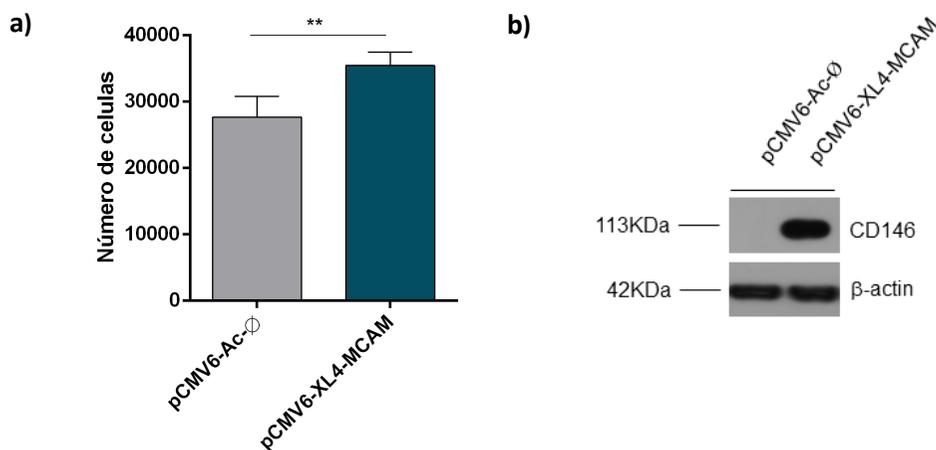


Figura 26. Adherencia de CMVL transfectadas con pCMV6-Ac- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM en cultivo. CMVL transfectadas con los plásmidos pCMV6- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM se tiñen con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Dil durante 30 minutos. 4×10^4 células se siembran en placas p12, por triplicado, y se incuban durante 30 minutos. Los pocillos se lavan para eliminar las células no adheridas y el número de células adheridas se determina cuantificando la emisión de fluorescencia a 590 nm. En cada experimento se recogen extractos de proteína y se confirma la sobreexpresión de CD146 mediante *western blot*. **a)** Representación del número de las CMVL adheridas. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 4 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada. $**p < 0.005$. **b)** *Western blot* representativo de la sobreexpresión de CD146 y la expresión de β -actina como control endógeno en las CMVL empleadas ($n=4$).

Estos resultados sugieren que el CD146 podría jugar un papel en la adhesión celular de las CMVL a la-ME, y en consecuencia participar en el control de la contractibilidad y resistencia vascular.

6.3. La sobreexpresión de CD146 no modifica la capacidad de migración de las CMVL en cultivo

En condiciones patológicas, como el AAA, las CMVL adquieren, entre otras características, la capacidad de proliferar y migrar y así poder reparar posibles daños de la pared arterial que se producen durante la enfermedad. Por otro lado, como hemos mencionado, el CD146 es una molécula multifuncional que participa en procesos como la migración y proliferación celular.

Por ello analizamos si el CD146 tiene algún efecto en la capacidad de migración de las CMVL mediante ensayos de herida con CMVL que sobreexpresan CD146 y sus controles.

Observamos que la diferencia entre la migración de las CMVL que sobreexpresan CD146 y sus células control no es estadísticamente significativa (porcentaje del área cerrada de la herida C: $38.90 \pm 7.552\%$; CD146: $60.12 \pm 20.05\%$, $p=0.2324$) (Figura 27).

Indicar que aunque la migración de las CMVL que sobreexpresan CD146 es superior, posiblemente no observamos significación estadística por la dispersión del ensayo debido al comportamiento variable entre los diferentes cultivos que, como se ha mencionado, provienen de individuos diferentes, lo cual hace que el error estándar sea muy alto.

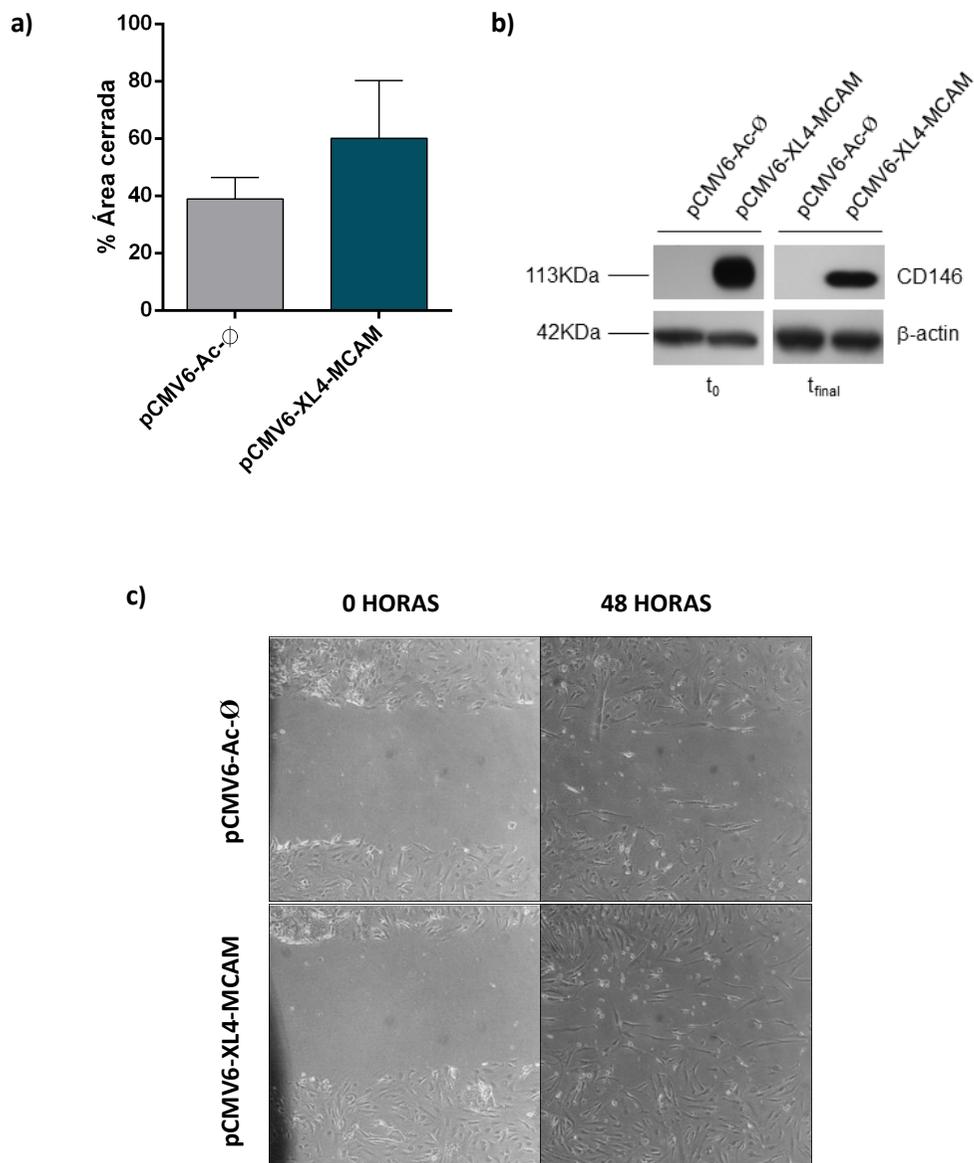


Figura 27. Migración de CMVL transfectadas con pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM a las 48 horas en cultivo. CMVL transfectadas con los plásmidos pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM se siembran en placas p12, por triplicado. Cuando llegan a confluencia se realiza la herida y se mantienen en cultivo durante 48 horas. Se adquieren imágenes fotográficas al microscopio de contraste de fases de manera periódica. En cada experimento se confirma la expresión de CD146 mediante *western blot*. **a)** Cuantificación del porcentaje de área cerrada a las 48 horas. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 3 experimentos independientes. **b)** *Western blot* representativo de CD146 y β -actina, como control endógeno, en las CMVL empleadas al inicio y a las 48 horas ($n=3$). **c)** Imágenes representativas de las heridas.

6.4. La sobreexpresión de CD146 no modifica la capacidad de proliferación de las CMVL en cultivo

Para estudiar si el CD146 tiene un papel en la capacidad de proliferación de las CMVL en cultivo realizamos ensayos de proliferación con XTT con CMVL que sobreexpresan CD146 y sus controles.

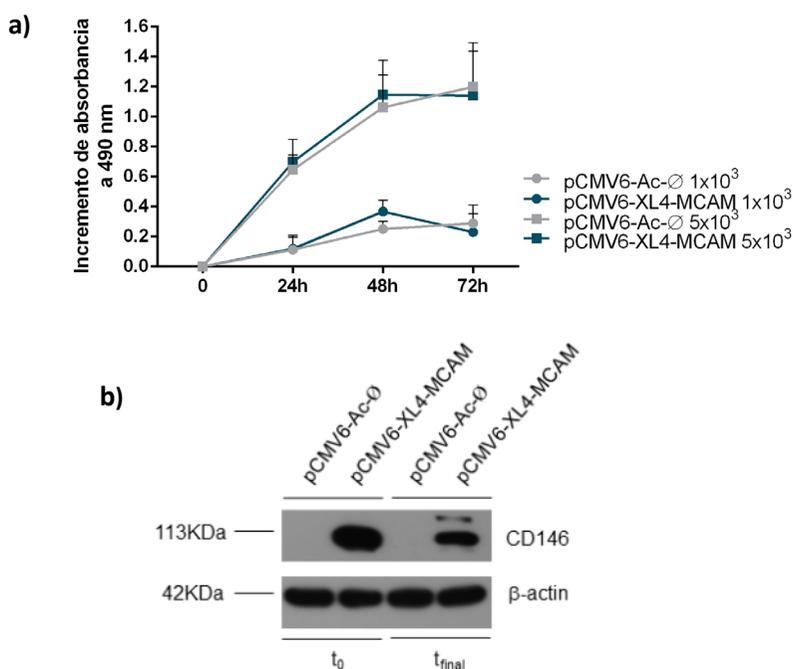


Figura 28. Cinética de tiempo de proliferación de las CMVL transfectadas con pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM en cultivo. CMVL transfectadas con pCMV6-Ac-∅ y pCMV6-XL4-MCAM se siembran en placas p96, por duplicado, a 2 inóculos diferentes, 1×10^3 y 5×10^3 . A distintos tiempos se añade XTT y se incuban 4 horas. El incremento de absorbancia se calcula restando a cada tiempo el valor de absorbancia de su tiempo 0. En cada experimento se confirma la expresión de CD146 mediante *western blot* **a)** Incremento de absorbancia a 490 nm a diferentes tiempos. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 4 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada. **b)** *Western blot* representativo de CD146 y β -actina como control endógeno en las CMVL empleadas ($n=4$).

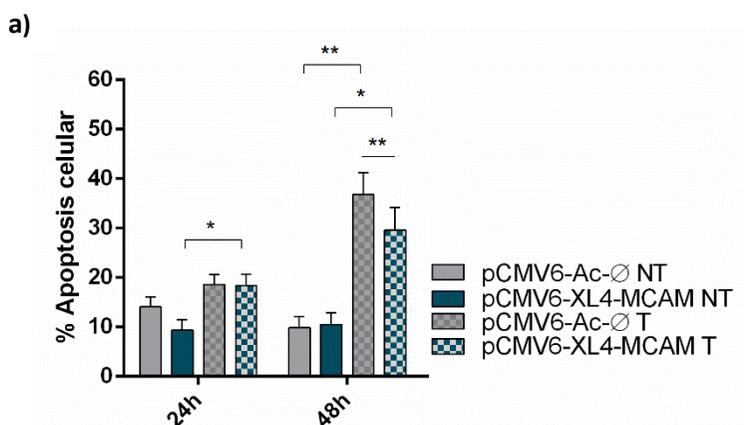
Como se puede observar la sobreexpresión de CD146 no modifica la proliferación de las CMVL ni en los cultivos de inóculo 1×10^3 (incremento de absorbancia a 490 nm a las 72 horas pCMV6-Ac- \emptyset : 0.289 ± 0.122 ; pCMV6-MCAM: 0.230 ± 0.122 , $p = 0.766$), ni en los del inóculo de 5×10^3 (pCMV6-Ac- \emptyset : 1.199 ± 0.296 ; pCMV6-MCAM: 1.141 ± 0.298 , $p = 0.690$) (Figura 28a).

6.5. El CD146 disminuye la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias en las CMVL en cultivo

La apoptosis de las CMVL es un proceso clave en el desarrollo y progresión del AAA. De hecho, la exagerada apoptosis de estas células es un factor determinante de la vulnerabilidad de la pared de la aorta que finalmente favorece la rotura del aneurisma.

Aunque se desconoce el mecanismo exacto, en el desencadenamiento de la apoptosis de las CMVL se han implicado diversas citoquinas secretadas por las células inflamatorias presentes en la lesión. Entre las citoquinas que se encuentran elevadas en el suero y tejido de aorta de los pacientes con AAA están el $IFN\gamma$, la $IL-1\beta$ y el $TNF\alpha$ (212). Asimismo, en un trabajo previo se ha demostrado que la combinación de estas tres citoquinas induce la apoptosis en las CMVL en cultivo (213).

Por ello, para determinar si el CD146 juega un papel en la respuesta de apoptosis de las CMVL, tratamos las CMVL que sobreexpresan CD146 y sus CMVL control con el cóctel de citoquinas: $IFN\gamma$, $IL-1\beta$ y $TNF\alpha$, y analizamos el porcentaje de células apoptóticas a diferentes periodos de tiempo por citometría de flujo.



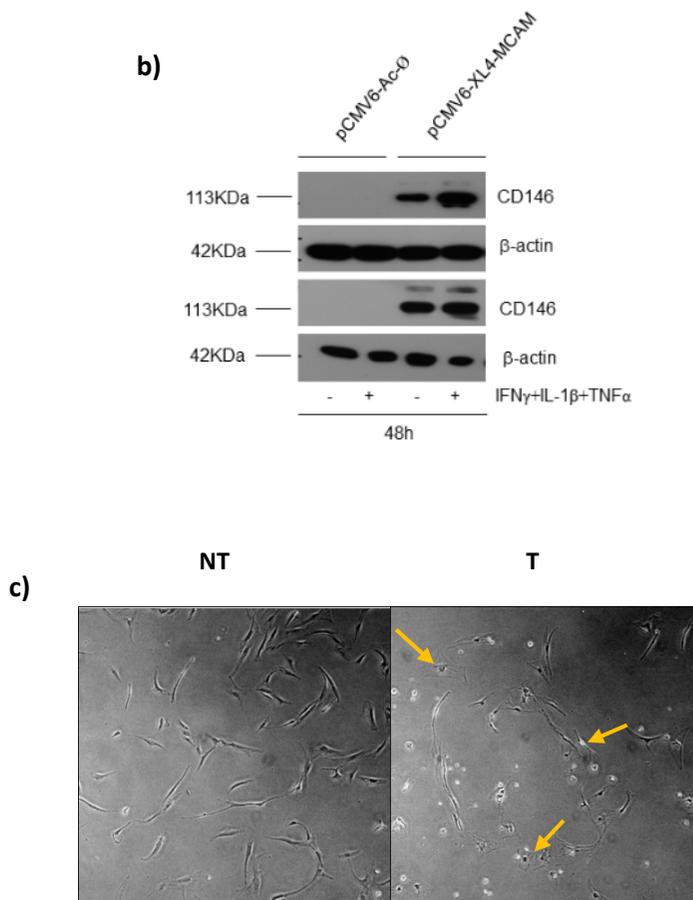


Figura 29. Apoptosis inducida por el cóctel de citoquinas (IFN- γ , IL1 β y TNF- α) en CMVL transfectadas con pCMV6-Ac- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM en cultivo. CMVL transfectadas con los plásmidos pCMV6-Ac- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM se siembran en frascos de 25cm² y se incuban en presencia (T), o ausencia (NT), del cóctel de citoquinas (800U/mL IFN- γ , 50U/mL IL1 β y 800U/mL TNF- α) durante 24 y 48 horas. La respuesta de apoptosis se analiza mediante citometría de flujo. En cada experimento se confirma la expresión de CD146 mediante *western blot*. **a)** Representación del porcentaje de células apoptóticas. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM) de 4 experimentos independientes. Los datos se comparan con la prueba *t-student* pareada. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **b)** *Western blot* representativo de la expresión de CD146 y de β -actina como control endógeno a las 48 horas (n=2). **c)** Imágenes representativas de la morfología de CMVL tratadas y no tratadas con el cóctel de citoquinas. Las flechas indican núcleos que presentan condensación de la cromatina.

A las 24 horas observamos que la inducción de apoptosis por el cóctel de citoquinas proinflamatorias es muy bajo, tanto en CMVL control (pCMV6-Ac-Ø NT: 14.05±2.062%; tratadas: 18.63±1.94%; p=0.0509), como en CMVL que sobreexpresan CD146 (pCMV6-XL4-MCAM NT: 9.36±2.087%; tratadas: 18.37±2.32%; p=0.0142), siendo en estas últimas la diferencia estadísticamente significativa.

A las 48 horas el tratamiento aumenta la respuesta de apoptosis tanto en CMVL control (pCMV6-Ac-Ø NT: 9.858±2.242%; T: 36.77±4.47% p=0.006), como en CMVL que sobreexpresan CD146 (pCMV6-XL4-MCAM NT: 10.50±2.414%; T: 29.65±4.58% p=0.016) (Figura 29a y 30). Cuando comparamos los cultivos de CMVL que sobreexpresan CD146 y sus controles tratadas, el porcentaje de la apoptosis inducida por el tratamiento es significativamente mayor en las CMVL control (pCMV6-Ac-Ø T: 36.77±4.47%; pCMV6-XL4-MCAM T: 29.65±4.58%. p=0.0011), mientras que no se observan diferencias entre las CMVL sin tratar (figura 29a).

El análisis por *western blot* muestra que el tratamiento con el cóctel de citoquinas no modifica la expresión de CD146 en las CMVL transfectadas (Figura 29b).

A nivel morfológico, observamos, al microscopio óptico de contraste de fases que las células tratadas con el cóctel de citoquinas presentan núcleos más grandes y condensación de la cromatina, característica de las células apoptóticas (214) (Figura29c).

Hemos demostrado que la desdiferenciación de las CMVL en la pared de la aorta del AAA va asociada a la pérdida de expresión de CD146. La apoptosis de las CMVL en el AAA es un efecto de la respuesta inflamatoria desencadenada y podría estar asociada a la desdiferenciación y pérdida de expresión de CD146 ya que, como nuestros resultados indican, la sobreexpresión de CD146 disminuye la apoptosis inducida por un cóctel de citoquinas proinflamatorias en CMVL en cultivo.

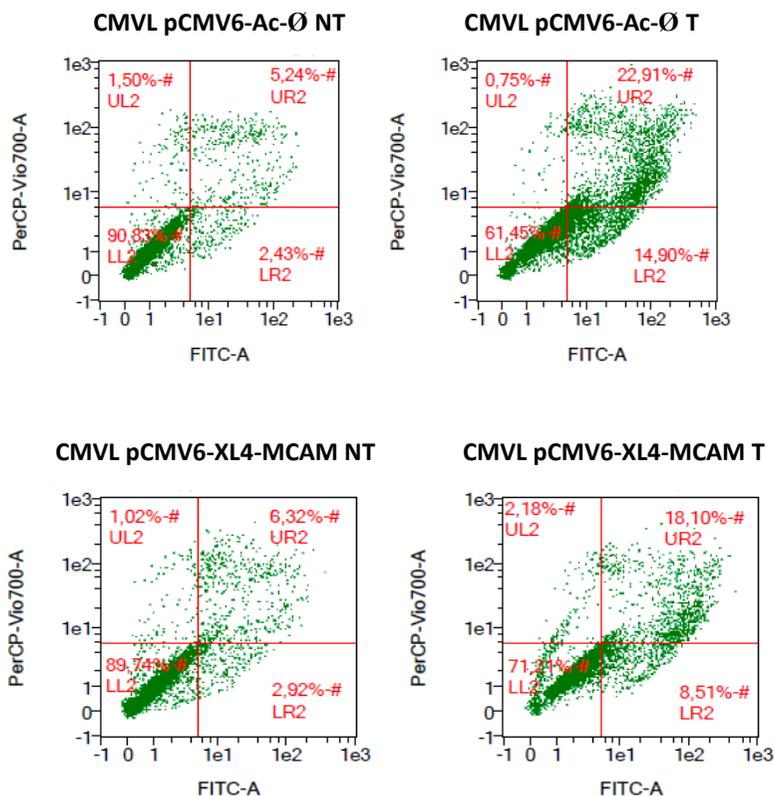


Figura 30. Gráficos de la distribución de poblaciones celulares teñidas con Anexina V FITC/IP y analizadas por citometría de flujo. CMVL transfectadas con los plásmidos pCMV6-Ac- \emptyset y pCMV6-XL4-MCAM se tratan con el cóctel de citoquinas (800 U/mL IFN- γ , 50U/mL IL1 β y 800U/mL TNF- α) y se evalúa la apoptosis por citometría de flujo a las 48 horas. Se muestran los gráficos de las 4 condiciones experimentales analizadas. Los recuadros de cada gráfico representan el área con el porcentaje de células vivas (abajo-izquierda), células en fase de apoptosis temprana (abajo derecha), células en fase de apoptosis tardía (arriba-derecha) y células necróticas (arriba-izquierda).

7. Estudio de la expresión de la forma soluble de CD146 (sCD146) en pacientes con AAA y controles sanos (C)

7.1. Los niveles de sCD146 en sangre de los pacientes con AAA están disminuidos

El CD146 presenta una forma soluble en sangre, sCD146, que participa en procesos inflamatorios y está diferencialmente expresada en enfermedades cardiovasculares. Debido a la necesidad de identificar nuevos biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico precoz y el seguimiento de la enfermedad para plantear la intervención quirúrgica en el momento en que el riesgo de rotura del AAA aumente, nos planteamos estudiar los niveles de expresión de sCD146 en plasmas de pacientes con AAA y C.

Mediante la técnica de ELISA observamos que los niveles de sCD146 están significativamente disminuidos en los plasmas de los pacientes con AAA en comparación con los niveles de los controles (AAA: 278.5 ± 8.794 ng/mL; C: 379.8 ± 9.125 ng/mL; $p < 0.0001$) (Figura 31).

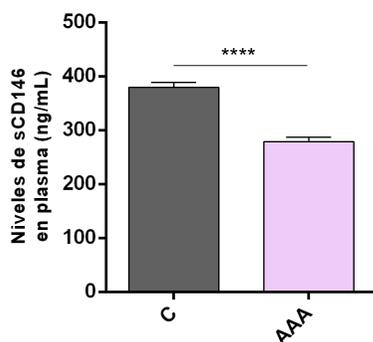


Figura 31. Niveles de sCD146 (ng/mL) en plasmas de pacientes con AAA y controles sanos (C).

Los niveles en plasmas de pacientes con AAA (n=87) y C (n=63) se analizan por ELISA. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM). Los datos se comparan con la prueba de *Mann Whitney*.

**** $p < 0.0001$.

Los datos demográficos de los donantes de plasma (tabla 13) muestran que existen diferencias significativas entre el grupo AAA y C respecto a la edad, el sexo y a los factores de riesgo dislipemia, HTC, EAP, ECI y EPOC. El uso de antiplaquetarios también es significativamente más alto en los pacientes con AAA. Para determinar si estas variables son confusoras, analizamos los niveles de sCD146 en cada grupo por separado y observamos que ninguna de estas variables influye estadísticamente en los niveles de sCD146 en plasma de los pacientes con AAA, ni en los controles.

La influencia de la edad en los niveles plasmáticos de sCD146 se analiza mediante una regresión lineal, donde sCD146 se considera la variable dependiente y la edad y edad² como variables independientes. No observamos dependencia de los niveles plasmáticos de sCD146 en ninguno de los dos grupos (AAA: $sCD146 = -1202.25 + 41.365 \times \text{edad} - 0.286 \times \text{edad}^2$, coeficiente edad $p=0.091$, coeficiente edad² $p=0.099$, $R=0.195$; C: $sCD146 = 616.601 - 10.121 \times \text{edad} + 0.0982 \times \text{edad}^2$, coeficiente edad $p=0.654$, coeficiente edad² $p=0.542$, $R=0.321$).

Además, realizamos el análisis de regresión lineal múltiple con todos los individuos, usando los niveles plasmáticos de sCD146 como variable dependiente y la presencia o ausencia de AAA, dislipemia, hipertensión, diabetes, PAD, BVD, IHD, COPD, CRF y uso de antiplaquetarios como variables independientes. En este caso sólo la presencia o ausencia de AAA afecta significativamente a los niveles de sCD146 ($[sCD146] = 375.068 - (87.622 \text{ presencia AAA}) - (22.580 \times \text{dislipemia}) + (7.917 \times \text{HTA}) + (18.267 \times \text{Diabetes}) - (34.807 \times \text{PAD}) - (30.965 \times \text{BVD}) + (5.919 \times \text{IHD}) + (2.936 \times \text{COPD}) - (12.382 \times \text{CRF}) + (25.505 \times \text{Anti-plaquetares})$; $N = 148$, $R = 0.569$; P de los Coeficientes: presencia AAA $p<0.001$, dislipemia $p=0.182$, HTA $p=0.596$, Diabetes $p=0.343$, PAD $p=0.06$, BVD $p=0.325$, IHD $p=0.777$, COPD $p=0.899$, CRF $p=0.585$, Antiplaquetares $p=0.161$). Por lo tanto, ninguno de estos parámetros ha sido tenido en cuenta como variables confusoras.

También hemos analizado los niveles de sCD146 liberados al medio de tejidos de AAA y NA en cultivo por ELISA, y observamos que los tejidos de AAA liberan menos CD146 que los tejidos de AN (AAA: $0.8598 \pm 0.06938 \text{ ng/mL}$; AN: $1.668 \pm 0.265 \text{ ng/mL}$; $p=0.0001$) (Figura 32).

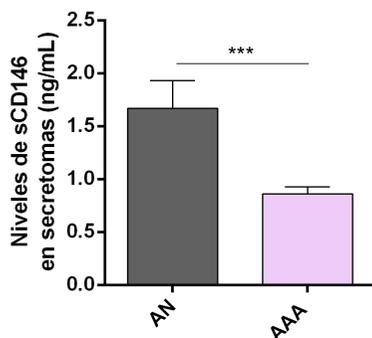


Figura 32. Niveles de sCD146 (ng/mL) en los secretomas de tejidos de AAA y AN. Los niveles de sCD146 en los secretomas de tejidos de AAA (n=14) y de AN (n=37) se analizan por ELISA. Se muestra la media \pm el error estándar (SEM), y los datos se comparan con la prueba *t-student* no pareada; ***p<0.001.

Asimismo, observamos que en los pacientes con AAA existe una correlación significativa entre los niveles de sCD146 circulantes y los niveles del ARNm de CD146 en el tejido (coeficiente de correlación de Pearson: $r=0.397$, $p = 0.00056$) (Figura 33a), y lo que es más interesante, observamos una correlación negativa significativa con el diámetro de la aorta (coeficiente de correlación de Pearson: $r = -0.252$, $p = 0.019$) (Figura 33b).

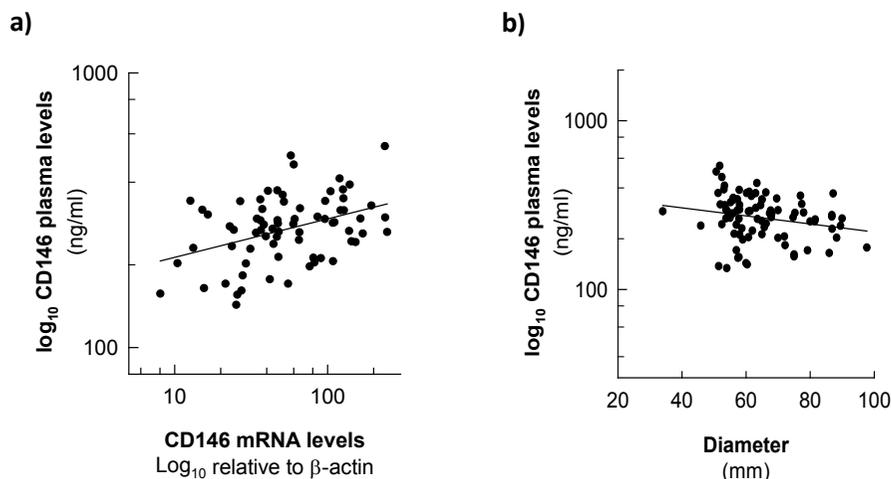


Figura 33. Correlación de los niveles de sCD146 (ng/mL) en plasmas de pacientes con AAA. a) Correlación entre los niveles de sCD146 (ng/mL) en plasma y los niveles de ARNm de CD146 en tejido de aorta de los pacientes con AAA (n=87); $r = 0.345$, $p = 0.0033$. **b)** Correlación entre los niveles de sCD146 en plasma y el diámetro (mm) de la aorta en pacientes con AAA (n=87); $r = -0.252$, $p = 0.0191$. La correlación entre los valores se realiza con la prueba *Pearson product moment correlation*.

7.2. El sCD146 podría ser un potencial biomarcador del AAA

La incidencia de muerte por rotura de la aorta en los pacientes con AAA es del 75% siendo el principal parámetro para estimar el riesgo de rotura el diámetro de la aorta. La mayoría de los pacientes con AAA son asintomáticos y desconocen que padecen esta enfermedad. Por ello, a la vista de los resultados del apartado anterior, analizamos el valor del sCD146 como marcador de diagnóstico del AAA.

Analizamos la capacidad de los niveles de sCD146 para clasificar a los individuos (presencia de AAA) mediante el uso de Árboles de Clasificación y Regresión (CART, de sus iniciales en inglés *classification and regression trees*) usando la condición AAA como variable dependiente. El análisis CART clasifica a los individuos en dos categorías: niveles bajos de sCD146 (≤ 322.34 ng/mL) y niveles altos de sCD146 (> 322.34 ng/mL) donde el grupo de niveles plasmáticos altos incluye el 31,1% de los pacientes con AAA, mientras que el grupo

de niveles bajos incluye un porcentaje significativamente más alto de pacientes con AAA (85.5%, $p > 0.001$) (Figura 34a).

A la vista de los resultados obtenidos con el análisis de CART, con la finalidad de determinar la capacidad diagnóstica de los niveles plasmáticos de sCD146 analizamos los niveles de sCD146 mediante una curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) incluyendo los C y los pacientes con AAA. El área bajo la curva (AUC, *area under curve*) para el sCD146 es 0.828 (95% CI: 0.762-0.893; $p < 0.001$) (Figura 34b).

Estos resultados demuestran que los niveles de sCD146 indican la presencia del AAA con alta especificidad y sensibilidad. Por consiguiente, el sCD146 puede ser un potencial biomarcador diagnóstico del aneurisma de aorta abdominal.

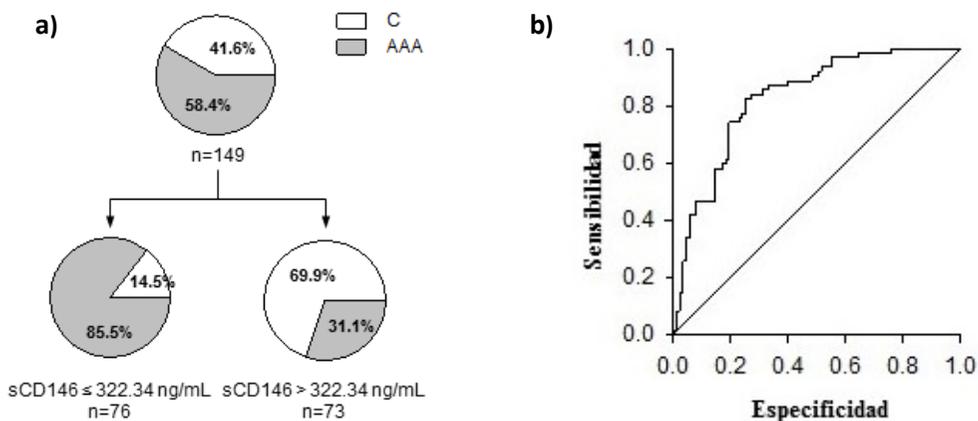


Figura 34. Análisis de los niveles de sCD146 como biomarcador de la presencia de AAA. a) Análisis de CART usando los niveles plasmáticos de sCD146 como variable independiente y la condición de presencia de AAA como variable dependiente (n=149). **b)** Curva ROC para el diagnóstico del AAA de los niveles de sCD146 (n=149; AUC: 0.828; $p=0.01$; 95% CI: 0.762-0.893).

V. DISCUSIÓN

El remodelado vascular es un proceso común a diversas patologías cardiovasculares entre ellas el AAA. Histológicamente el AAA se caracteriza por el remodelado de la media, proceso activo en el que se producen cambios estructurales de la pared vascular (15), con evidencia de inflamación crónica, hipervascularización, destrucción de la lámina elástica y depleción del musculo liso (52). Las CMVL juegan un papel fundamental en este proceso de remodelación modulando su fenotipo de contráctil a sintético como respuesta a la lesión aneurismática. De hecho, la ME está sometida a una gran rotación con una degradación y deposición o modificación continua (215) de proteínas sintetizadas de nuevo por las CMVL (216).

En la presente tesis, en primer lugar, hemos estudiado la estructura de la pared de la aorta en el AAA. Mediante tinciones histológicas comparamos la estructura de la pared de la aorta de biopsias procedentes de pacientes de AAA y de donantes multiorgánicos, AN, y hemos observado que la pared de los tejidos patológicos presenta importantes alteraciones en la estructura. Por un lado, se observa una disminución de citoplasma celular y una disminución y desorganización de fibras musculares, CMVL, en la capa media. Ésto va acompañado por un gran incremento de las fibras de colágeno en la ME. Por otro lado, la tinción negativa de los polisacáridos que conforman la MB indica una pérdida de la estructura de la misma, lo que sugiere que se produce una degradación y/o modificación de PG y otras glucoproteínas, como por ejemplo las lamininas, proteínas altamente glicosiladas (21).

Además, los tejidos de AAA presentan un infiltrado inflamatorio focal, predominantemente en la adventicia, con tendencia a formar nódulos y la presencia de algunos trombos.

Está descrito que la pérdida de las CMVL que observamos es por apoptosis debido a la actividad del infiltrado inflamatorio en los tejidos patológicos. Una vez desencadenado el proceso, la presencia de CMVL apoptóticas favorece el reclutamiento de nuevas células inflamatorias produciéndose una respuesta de retroalimentación positiva que agrava la lesión (216).

Aún no se conoce el orden de los eventos patológicos y su contribución directa en el AAA (217). No obstante, la afluencia de las células productoras de MMP como monocitos y macrófagos, produce un incremento de los niveles de las MMP (218) que unido al hecho de que el mayor inhibidor de las MMP, TIMP-1, se encuentra disminuido en el AAA, contribuye a la degradación de la ME (219).

Como se ha descrito previamente, la destrucción de la ME por parte de las MMP constituye uno de los pilares fundamentales de la fisiopatología de los AAA. Las MMP y sus formas activas están sobreexpresadas en tejidos de AAA (56) (58) (218) (220) (221) (222) (223). Por ejemplo la MMP-9, la más característica del AAA, degrada el colágeno IV y la MMP-3, cuya

expresión es inducida en las CMVL en respuesta a la netrina-1 liberada por los macrófagos, es capaz de degradar muchos de los componentes de la matriz, incluyendo la fibronectina, las lamininas y los PG (224).

El desarrollo del AAA también está relacionado con modificaciones cuantitativas y estructurales de los glicosaminoglicanos (GAG), polisacáridos estructurales que unidos a un núcleo proteico forman PG (225) (226) (227). El contenido general de GAG en el AAA disminuye un 60% respecto a la aorta normal (225) (227), que supone una disminución del 90% del heparan sulfato (HS), 73% del ácido hialurónico (HA), 65% del condroitin sulfato (CS) y 8% de dermatan sulfato (DS) (225). Los macrófagos son capaces de degradar los HSPG y CSPG. Curiosamente, los HSPG sirven como organizadores estructurales de los componentes de la MB (228).

Esto explica la degradación concertada de la estructura de la ME y MB que observamos en los tejidos de AAA, fruto de la actividad desarrollada por las células inflamatorias y de la remodelación de la matriz que realizan las CMVL (225).

En comparación a la MB endotelial, el conocimiento de las lamininas que componen la MB de las CMVL es escaso, tanto en condiciones normales como patológicas (15).

Hemos analizado la expresión a nivel de ARNm y hemos observado una expresión diferencial de las cadenas α de las lamininas y del receptor DAG-1. Esta expresión diferencial de los niveles de ARNm de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de la laminina y del receptor DAG-1 entre los tejidos de AAA y AN, indica que además de un cambio estructural, la MB de los tejidos de AAA presenta cambios funcionales, ya que las lamininas, además de contribuir a la estructura de la MB, asumen diferentes funciones biológicas. Cuando las cadenas α interactúan con los receptores de membrana de la superficie celular se activan distintas vías de transducción de señal (15) (21).

El ARNm del receptor DAG-1 está sobreexpresado en tejidos de AAA respecto a tejidos de AN. DAG-1 codifica para las proteínas α - y β -DG (30) que participan en la unión citoesqueleto celular-MB. No se sabe mucho sobre su distribución pero su expresión en los vasos sanguíneos se asocia principalmente al músculo liso (229). No obstante, los niveles de expresión de DAG-1 afectan al comportamiento y al fenotipo de las células endoteliales vasculares y se ha sugerido que su expresión está regulada al alza en el endotelio durante la angiogénesis tumoral (230). El AAA se caracteriza por la hipervascularización, lo cual podría explicar el incremento del ARNm de DAG-1 en este tejido. Asimismo, la isoforma α -DG tiene un patrón de expresión diferencial que depende del tipo de célula endotelial o posiblemente del tipo de tejido (230).

Existe poca información sobre la expresión de la cadena $\alpha 3$ de la laminina en la aorta, únicamente se ha descrito que se expresa en la aorta a lo largo de las etapas que componen la embriogénesis (231).

Se ha asociado la sobreexpresión de las cadenas $\alpha 2$ y $\alpha 4$ de la laminina a procesos inflamatorios. En la aterosclerosis, la cadena $\alpha 2$ de la laminina se encuentra sobreexpresada en la media asociada a la placa (15) y en condiciones inflamatorias la isoforma de la laminina 411 se encuentra regulada al alza en la MB endotelial vascular (25). Por lo tanto, esto podría explicar la sobreexpresión del ARNm de ambas cadenas en los tejidos de AAA.

La expresión de ARNm de la cadena $\alpha 5$ de la laminina en cambio, está disminuida en los tejidos de AAA respecto a los tejidos de AN. Se ha descrito que esta laminina juega un papel en la inhibición de la trans migración de leucocitos en el endotelio (224) (232) y su expresión se ha asociado con el mantenimiento del fenotipo diferenciado de las células endoteliales (233). Los datos obtenidos hasta la fecha apoyan un papel para la cadena $\alpha 5$ de la laminina en la inhibición de la migración a través o en la pared del vaso y en la promoción de la diferenciación de las células murales, y potencialmente también en la mecanosensibilidad y mecanotransducción, procesos que son fundamentales para la homeostasis vascular y que están alterados en patologías caracterizadas por un remodelado vascular (21). Así, la inhibición de su expresión podría favorecer la entrada de las células inflamatorias a la pared del vaso patológico.

La variación del fenotipo de las células endoteliales se ha asociado con cambios en la expresión de isoformas de laminina (21). Sin embargo, los estudios publicados no abordan roles de las isoformas específicas de laminina en el cambio fenotípico de las CMVL o la vasoconstricción (21). De igual manera, no se ha identificado el receptor responsable de mantener el fenotipo contráctil de las CMVL (2) (21), aunque algunos estudios demuestran que la integrina $\alpha 7\beta 1$ es necesaria para la expresión del fenotipo contráctil de las CMVL (2) (21) (234) y sugieren que el α -DG también podría actuar como receptor de las CMVL contráctiles en ausencia de la integrina $\alpha 7\beta 1$ (21).

La integrina $\alpha 7\beta 1$ es capaz de unirse a las cadenas $\alpha 2$, -4 y -5 de la laminina en las CMVL. La falta de interacción entre la integrina $\alpha 7\beta 1$ con alguna, o algunas, de estas cadenas de laminina reduce la expresión de las proteínas contráctiles del músculo liso *in vivo* y promueve la proliferación de las CMVL vía la ruta Ras-MAPK (21). Asimismo, el α -DG presenta una alta afinidad de unión a las cadenas α -2 y -5 de la laminina (21) y en tejidos maduros la expresión de DAG-1 colocaliza con la expresión de la cadena $\alpha 5$ de la laminina (229).

Por todo ello, creemos que nuestros resultados indican que la cadena $\alpha 5$ de la laminina podría jugar un papel en el desarrollo del AAA y que su disminución podría correlacionarse con el cambio de fenotipo de las CMVL. Aunque no está claro si la implicación de la cadena $\alpha 5$ de la laminina en el mantenimiento del fenotipo contráctil es a través de la integrina $\alpha 7\beta 1$, DAG-1 u otro receptor, o combinación de receptores.

En este trabajo, hemos analizado los niveles de lamininas cuantificando los niveles de ARNm. Para caracterizar su expresión y determinar el papel de las cadenas α de las lamininas en el AAA, habría que analizar su expresión a nivel de proteína en los tejidos de AAA y valorar si la síntesis de las isoformas de laminina está modificada. Únicamente un estudio proteómico realizado con tejidos de AAA y AN ha demostrado la disminución de la subunidad de la cadena $\alpha 5$ de la laminina en tejidos de AAA (216).

No existen estudios sobre la expresión/distribución *in vivo* de los componentes de la MB del músculo liso de los vasos sometidos a procesos de remodelación y como los cambios en la composición afectan a la función del musculo liso (21), estudios que, a la vista de nuestros resultados, aportarían información muy relevante sobre la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares.

El principal objetivo de esta tesis ha sido caracterizar la expresión de CD146 y su forma soluble, sCD146, así como su papel en el AAA. Este receptor de membrana forma parte de la unión de las células de la pared vascular, células endoteliales, CMVL y pericitos, a la MB. Asimismo, sus niveles se han asociado a la presencia de enfermedad cardiovascular, inflamación crónica y disregulación inmunitaria, enfermedades que conducen a daño endotelial y fallo de la reparación vascular.

En este trabajo hemos demostrado por primera vez que la expresión de CD146, tanto a nivel de ARNm como de proteína, está disminuida en los tejidos de aorta aneurismática respecto de la aorta normal.

Cuando analizamos la expresión local del CD146 en la pared aneurismática, nuestros resultados muestran que el CD146 se expresa fundamentalmente en las células vasculares, CMVL y endoteliales de la microvasculatura y que la disminución de la expresión de CD146 observada en el tejido de AAA está asociada a la disminución de su expresión en las CMVL de la capa media.

Para tratar de determinar el papel del CD146 en el AAA, dado que la disminución de la expresión en el AAA está asociada a las CMVL de la media, hemos utilizado cultivos primarios de CMVL procedentes de aortas humanas. El método de aislamiento influye en el estado de

diferenciación y proliferación de las CMVL. Las CMVL obtenidas por el método de explante presentan un fenotipo desdiferenciado y hemos observado que no expresan CD146.

Utilizamos el tratamiento con TGF- β 1 como modelo para estudiar el efecto de la diferenciación sobre la expresión de CD146 en las CMVL. Las características morfológicas de las CMVL tratadas con TGF- β 1 se corresponden con el fenotipo diferenciado, las células presentan morfología de huso y además una tasa de proliferación inferior a las células control. El análisis de los biomarcadores de diferenciación o fenotipo contráctil, Calponina-1, TAGLN y SM-MHC, mostró que el tratamiento con TGF- β 1 aumenta su expresión además de la disminución de la expresión de S100A4 a nivel transcripcional y de proteína. El tratamiento también indujo la expresión de CD146. Estos resultados indican que la expresión de CD146 está asociada al fenotipo de las CMVL y que el CD146 se expresa cuando las células presentan un fenotipo diferenciado.

En los tejidos de aorta, los niveles de expresión de ARNm y proteína de los marcadores del fenotipo contráctil, Calponina-1, TAGLN y SM-MHC, están disminuidos en el AAA respecto a la AN. Mediante inmunohistoquímica demostramos que esta disminución no es únicamente debida a la disminución del número de CMVL en el tejido patológico, sino que está causada, fundamentalmente, por el cambio en la expresión de estas proteínas en las CMVL.

En contra de los resultados esperados los niveles de expresión de ARNm del S100A4 no presentan diferencias significativas entre ambos tejidos, y además la expresión de proteína disminuye en los tejidos de AAA. Sin embargo, los ensayos de inmunohistoquímica indican que la expresión de S100A4 es más intensa en las CMVL de la capa media de los tejidos de AAA.

Utilizando tinciones histológicas de doble inmunofluorescencia confirmamos que el CD146 colocaliza con los marcadores musculares en las CMVL de la capa media del tejido de aorta normal. En el tejido aneurismático es difícil observar la coexpresión del CD146 con las distintas proteínas debido a la baja intensidad de la tinción por la disminución de los niveles de expresión. En el caso del S100A4, su expresión aumenta en el tejido de AAA y además de las CMVL una parte de las células del infiltrado inflamatorio lo expresan.

En distintas situaciones, macrófagos, fibroblastos, linfocitos activados y las células endoteliales expresan S100A4 (235) (236). En la media de los tejidos de AAT se ha observado una correlación entre la expresión de las MMP -2, MMP-9 y S100A4 (237), y se sabe que el S100A4, vía extracelular, induce el cambio de fenotipo de las CMVL de contráctil a sintético, que incluye, además de la disminución de la expresión de los marcadores del fenotipo contráctil, el incremento de la producción de las MMP, MMP-1, -2, -3 y -9. La transición fenotípica inducida por S100A4 puede estar mediada por la codependencia entre el receptor

de los productos de glicación avanzada, incrementado en el AAA y cuya expresión se asocia a la producción de la MMP-9, y otros receptores aún no identificados (7) (238).

Por todo ello, creemos que una parte de la expresión de S100A4 en el tejido de aorta tanto AN como AAA, es debida a las CMVL de la capa media, y los niveles de expresión más intensos de S100A4 a su vez, corroboran que las CMVL en el AAA están desdiferenciadas. No obstante, y aparentemente en contradicción con los resultados de inmunohistoquímica, cuando analizamos los niveles de expresión en el tejido de AAA observamos que el S100A4 está disminuido, aunque las diferencias no son significativas a nivel de ARNm, probablemente debido a la disminución del número de CMVL en los tejidos de AAA.

Teniendo en cuenta estos resultados y los resultados obtenidos en los cultivos celulares, el perfil de biomarcadores nos indica que el fenotipo de las CMVL en el AAA corresponde al desdiferenciado o sintético. Asimismo, este trabajo demuestra que la expresión de CD146 en las CMVL está correlacionada con el fenotipo contráctil de las mismas y que en los tejidos humanos de AAA la pérdida de su expresión se debe a la desdiferenciación de las CMVL.

Hay evidencias que sugieren la implicación activa del CD146 en procesos de diferenciación. Por ejemplo, las células madre de la médula ósea presentan una expresión de CD146 heterogénea, y presentan la capacidad de diferenciarse en CMVL, *in vivo*, a través de trasplante, e *in vitro*, mediante el bloqueo de la vía ERK/MAPK (175) (239). La expresión de CD146 puede depender del tejido y del entorno molecular, pero en las CMM se ha identificado como marcador característico y predictivo para el compromiso a diferenciarse al linaje de CMVL (175).

A pesar de que el mecanismo exacto implicado en la regulación del fenotipo de las CMVL no esté del todo establecido, se sabe que la expresión de los genes marcadores del fenotipo contráctil de las CMVL es dependiente de la interacción entre múltiples elementos CArG box y SRF (12) (13). No obstante, la transcripción dependiente de SRF está controlada en gran medida, por la interacción del SRF con factores de transcripción adicionales y coactivadores, como por ejemplo, miocardina (240). El promotor de CD146 también contiene el elemento de regulación CArG box y el TGF- β promueve la interacción de SRF con el CArG box (175).

En los cultivos primarios hemos observado que la sobreexpresión de CD146 no está implicada en los mecanismos que controlan la regulación génica del fenotipo en las CMVL en cultivo. Su expresión por sí sola no induce el fenotipo contráctil. Sin embargo, queda por esclarecer si la regulación de la expresión de cada uno de los genes marcadores y del CD146 está, o no, controlada por los mismos factores.

Las principales funciones de las CMVL de las arterias son producir movimientos contráctiles y mantener la resistencia vascular. La adhesión entre las CMVL y la ME se fortalece para resistir tensiones considerables debido a la contracción de las propias CMVL y las fuerzas hemodinámicas (2). Para reparar las lesiones de la pared arterial que pueden producirse durante la enfermedad vascular, las CMVL se desdiferencian y adquieren funciones sintéticas, migratorias y proliferativas. Esto se correlaciona con la alteración de la expresión de los receptores de adhesión que unen las células a la ME. En nuestro trabajo hemos encontrado correlación de la desdiferenciación de las CMVL con la pérdida de expresión de CD146.

El CD146 a través de su interacción con diferentes ligandos facilita las uniones célula-célula y célula-ME y juega un papel importante en la función endotelial. Su silenciamiento inhibe la adhesión de las células endoteliales, así como la migración y la proliferación (182). Sin embargo, su papel en las CMVL no ha sido estudiado.

Los ensayos funcionales realizados con los cultivos de CMVL en este trabajo demuestran que la sobreexpresión de CD146 resulta en un aumento de la adhesión de las CMVL al sustrato. Esto sugiere que el CD146 posiblemente juega un papel en la adhesión de las CMVL a la ME, y por consiguiente participa en el control de la contractilidad y resistencia vascular. Por el contrario, la sobreexpresión de CD146 no provoca cambios en la capacidad de migrar y proliferar en las CMVL en cultivo, lo que sugiere que son otros receptores los que participan en la regulación de estas funciones.

Por ejemplo, la integrina $\alpha 5\beta 1$ que se expresa en abundancia en las CMVL en cultivo, participa en el cambio fenotípico de las CMVL, de contráctil a sintético y a través de su unión a la fibronectina favorece la migración de las CMVL. También, mediante su implicación en la polimerización de la fibronectina, juega un papel en la proliferación de las CMVL de la neoíntima. Asimismo, la integrina $\alpha v\beta 3$, cuya expresión y la de sus ligandos está sobreexpresada en la pared de los vasos patológicos, está implicada en la migración, *in vitro* e *in vivo*, y proliferación de las CMVL. De hecho, en varios tipos celulares se ha confirmado la asociación de la integrina $\alpha v\beta 3$ con los receptores de los factores de crecimiento, lo que indica que juega un papel en la regeneración de tejidos (2).

La regulación de la proliferación y de la muerte por apoptosis en las CMVL es importante en la configuración de la estructura de la pared vascular, el predominio de uno de estos procesos juega un papel determinante en el desarrollo de las patologías vasculares. En este sentido, se sabe que el bloqueo de la integrina $\alpha v\beta 3$ induce la apoptosis de las CMVL y a su vez, reduce el engrosamiento de la íntima en procesos como la restenosis (241).

En los cultivos de CMVL también hemos demostrado que la sobreexpresión de CD146 mediante transfección transitoria disminuye la respuesta de apoptosis inducida por un cóctel de citoquinas. El cóctel de citoquinas que hemos empleado para inducir la apoptosis está compuesto por IFN γ , IL-1 β y TNF α , citoquinas proinflamatorias que se encuentran elevadas en el suero y en el tejido de aorta de los pacientes con AAA (212) (213).

La apoptosis de las CMVL es un efecto de la respuesta inflamatoria desencadenada en la pared de aorta del AAA y esta respuesta podría estar asociada a la desdiferenciación de las CMVL. Por ello, los resultados obtenidos con los cultivos nos indican que el CD146 podría jugar un papel en la supervivencia celular y que la pérdida de su expresión en las CMVL desdiferenciadas en el AAA podría asociarse a la muerte por apoptosis de las CMVL.

El CD146 actúa como correceptor del VEGFR2 e induce la activación de NF- κ B. Así, induce la proliferación y supervivencia celular y la angiogénesis (183) (184) (185) (186) (187) (188). La deficiencia de CD146 está asociada con la regulación a la baja y al alza de las vías canónicas y no canónicas de Wnt, respectivamente, lo cual conduce a un estado profibrótico celular (152). En células de melanoma humano, su sobreexpresión activa la cascada PI3K/AKT endógena. La fosforilación de PI3K/AKT promueve la expresión de CD146 dando lugar a una retroalimentación positiva que promueve la supervivencia tumoral. Sin embargo, aún se desconoce si dicho mecanismo se produce en otras células tumorales y en células sanas (179).

No sabemos si el CD146 activa estas vías de señalización en las CMVL diferenciadas de la aorta sana favoreciendo su supervivencia, o si interacciona con algún receptor de adhesión, directamente o a través de alguna isoforma de laminina, y participa en una vía de señalización que promueve la supervivencia celular, y si esta vía es inhibida con la desdiferenciación de las CMVL. En cualquier caso, su efecto en la adhesión y en la inhibición de la respuesta de apoptosis en las CMVL en cultivo, indica que es importante el estudio de su papel en el AAA y su potencial como diana terapéutica.

La utilización de biomarcadores moleculares se está convirtiendo en una herramienta esencial para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de enfermedades. Hemos analizado los niveles plasmáticos de la forma circulante de CD146, sCD146, y hemos demostrado que estos niveles disminuyen significativamente en los pacientes con AAA respecto a los controles sanos. El análisis de regresión lineal indica que ninguna otra condición, únicamente la presencia o ausencia del AAA influye en los niveles plasmáticos de sCD146. Además, hemos observado que los niveles de sCD146 indican la presencia del AAA con alta especificidad y sensibilidad.

La identificación de biomarcadores clínicamente útiles ha sido un área de investigación muy activa, con un gran número de artículos científicos que afirman haber identificado una amplia gama de biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos de enfermedades humanas. Hasta la fecha, en el AAA se han estudiado niveles circulantes de moléculas relacionados con la actividad proteolítica e inflamatoria como candidatas a biomarcadores. Sin embargo, no se ha demostrado su valor como predictoras del riesgo clínico (111) (242) y el hecho de que la aterosclerosis y otras patologías cardiovasculares coexistan con el AAA limita su sensibilidad y especificidad. Los estudios proteómicos han sido útiles para encontrar nuevos biomarcadores candidatos que aporten conocimiento acerca de la fisiopatología del AAA, pero en última instancia, las concentraciones en plasma representan la actividad de toda la vasculatura en lugar de un área de lesión vascular focal (110). El análisis de las moléculas de la superficie celular de la pared arterial patológica también puede aportar información relevante de la enfermedad. Sin embargo, el estudio *in vivo* es laborioso y los modelos de que disponemos son de dudosa utilidad y por otro lado, la obtención de muestras humanas de AAA se ha dificultado debido al incremento de la cirugía endovascular frente a la cirugía abierta.

En un trabajo previo que realizamos en nuestro laboratorio demostramos que la quimoquina CCL20 predice con una alta sensibilidad la presencia de AAA. Los niveles circulantes de un mediador inflamatorio aporta información acerca de su concentración en el tejido en un momento concreto, por lo que sus niveles plasmáticos se asocian a la intensidad de la respuesta inflamatoria de ese momento, en lugar de asociarse a la intensidad de la lesión (110).

A diferencia de los resultados obtenidos con la CCL20, los niveles plasmáticos de sCD146 de los pacientes con AAA se correlacionan con los niveles de ARNm de CD146 en tejido. Y lo que es más interesante, hay correlación negativa significativa entre los niveles de sCD146 y el diámetro de la aorta en los pacientes con AAA. Es decir, los niveles de sCD146 disminuyen a medida que el diámetro de la aorta aumenta, principal parámetro para estimar el riesgo de rotura del AAA.

Varios trabajos sugieren que el sCD146 desempeña un papel en los procesos de inflamación vascular y le atribuyen propiedades proangiogénicas y proinflamatorias. Los niveles circulantes de las CAM son el resultado de la escisión de las moléculas de adhesión de membrana (207). Por ello, nosotros creemos que los niveles de sCD146 en los plasmas de pacientes con AAA son una representación de lo que está sucediendo en el tejido patológico.

Además, ya se ha sugerido que las concentraciones en plasma de una determinada molécula representan la actividad de toda la vasculatura en lugar del área de la lesión focal (110), y

teniendo en cuenta que estos pacientes presentan afecciones en todo el árbol vascular (37), nuestros resultados apoyan la idea de que el AAA es una enfermedad sistémica.

En conclusión, creemos que este trabajo demuestra la importancia de la interacción de las CMVL con la MB en el desarrollo de la enfermedad y que abre una nueva línea de investigación en el campo del AAA. Las alteraciones de la pared del tejido de AAA humano se asocian a cambios en la expresión de las cadenas α de la laminina y al DAG-1 de la MB, así como a la desdiferenciación de las CMVL. La desdiferenciación de las CMVL va acompañada de la disminución de la expresión de CD146 y nuestros resultados indican que esta pérdida de expresión afecta negativamente a la adhesión de las CMVL a la MB y a su supervivencia y por lo tanto podría estar implicada en la progresión de la enfermedad. Asimismo, este trabajo propone el sCD146 como potencial biomarcador que permitiría un diagnóstico precoz que podría evitar someter al paciente a pruebas invasivas y de alto coste socio-económico.

VI. CONCLUSIONES

- I.** La pared de la aorta del AAA presenta alteraciones en la estructura y en la expresión de ARNm de las cadenas α -2, -3, -4 y -5 de las lamininas y del DAG-1 de la membrana basal.
- II.** La expresión de CD146 está significativamente disminuida en el tejido de AAA en comparación con el tejido de AN humana.
- III.** La expresión de CD146 está asociada a la desdiferenciación de las CMVL de la capa media en el tejido de AAA.
- IV.** La sobreexpresión de CD146 aumenta la capacidad de adhesión y disminuye la apoptosis inducida por citoquinas proinflamatorias en CMVL en cultivo pero no afecta la capacidad de proliferación ni migración.
- V.** Los niveles plasmáticos de la forma circulante del CD146, sCD146, son significativamente inferiores en pacientes con AAA que en controles sanos y se correlacionan significativamente con el diámetro de la aorta.
- VI.** El análisis estadístico muestra que los niveles plasmáticos de sCD146 podría ser un biomarcador diagnóstico que predice la presencia de AAA desde las fases tempranas de la enfermedad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Krestan, A. L. Bisset, and A. Khan, *Differential Diagnosis in Abdominal ultrasound*, 2nd edition - W.B. Saunders Company, 2002.
- [2] E. P. Moiseeva, "Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 52, no. 3, pp. 372–386, Dec. 2001.
- [3] K. Kawai-Kowase and G. K. Owens, "Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 292, no. 1, pp. C59-69, Jan. 2007.
- [4] E. M. Rzucidlo, K. A. Martin, and R. J. Powell, "Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 45 Suppl A, pp. A25-32, Jun. 2007.
- [5] G. K. Owens, M. S. Kumar, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, Jul. 2004.
- [6] H. Obata *et al.*, "Smooth muscle cell phenotype-dependent transcriptional regulation of the alpha1 integrin gene.," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 42, pp. 26643–26651, Oct. 1997.
- [7] C. Chaabane, C. W. Heizmann, and M.-L. Bochaton-Piallat, "Extracellular S100A4 induces smooth muscle cell phenotypic transition mediated by RAGE.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1853, no. 9, pp. 2144–2157, Sep. 2015.
- [8] H.-L. Hsieh, B. W. Schäfer, B. Weigle, and C. W. Heizmann, "S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, no. 3, pp. 949–959, Apr. 2004.
- [9] E. J. Kim and D. M. Helfman, "Characterization of the metastasis-associated protein, S100A4. Roles of calcium binding and dimerization in cellular localization and interaction with myosin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 32, pp. 30063–30073, Aug. 2003.
- [10] A. Mandinova, D. Atar, B. W. Schafer, M. Spiess, U. Aebi, and C. W. Heizmann, "Distinct subcellular localization of calcium binding S100 proteins in human smooth muscle cells and their relocation in response to rises in intracellular calcium.," *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 1, pp. 2043–2054, Jul. 1998.
- [11] A. C. Brisset *et al.*, "Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro.," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 7, pp. 1055–1062, Apr. 2007.

- [12] I. Manabe and G. K. Owens, "CARG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo.," *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 7, pp. 823–834, Apr. 2001.
- [13] J. M. Miano, M. J. Carlson, J. A. Spencer, and R. P. Misra, "Serum response factor-dependent regulation of the smooth muscle calponin gene.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 13, pp. 9814–9822, Mar. 2000.
- [14] T. Yoshida, K. H. Kaestner, and G. K. Owens, "Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury.," *Circ. Res.*, vol. 102, no. 12, pp. 1548–1557, Jun. 2008.
- [15] U. Rauch *et al.*, "Laminin isoforms in atherosclerotic arteries from mice and man.," *Histol. Histopathol.*, vol. 26, no. 6, pp. 711–724, Jun. 2011.
- [16] D.-C. Guo *et al.*, "Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections.," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 12, pp. 1488–1493, Dec. 2007.
- [17] H. Pannu *et al.*, "MYH11 mutations result in a distinct vascular pathology driven by insulin-like growth factor 1 and angiotensin II.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 16, no. 20, pp. 2453–2462, Oct. 2007.
- [18] B. J. van Varik, R. J. M. W. Rennenberg, C. P. Reutelingsperger, A. A. Kroon, P. W. de Leeuw, and L. J. Schurgers, "Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases.," *Front. Genet.*, vol. 3, p. 290, Dec. 2012.
- [19] G. Ailawadi *et al.*, "Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms.," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 138, no. 6, pp. 1392–1399, Dec. 2009.
- [20] R. Kalluri, "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 422–433, Jun. 2003.
- [21] L. F. Yousif, J. Di Russo, and L. Sorokin, "Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes.," *Cell Adh. Migr.*, vol. 7, no. 1, pp. 101–110, Jan. 2013.
- [22] E. Pöschl, U. Schlötzer-Schrehardt, B. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya, and U. Mayer, "Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development.," *Development*, vol. 131, no. 7, pp. 1619–1628, Apr. 2004.

- [23] M. Aumailley *et al.*, “A simplified laminin nomenclature.,” *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 326–332, Aug. 2005.
- [24] T. Ishikawa *et al.*, “Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via $\alpha 6\beta 1$ integrin and MCAM (CD146).,” *Matrix Biol.*, vol. 38, pp. 69–83, Sep. 2014.
- [25] K. Flanagan *et al.*, “Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS.,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, p. e40443, Jul. 2012.
- [26] M. Sixt, B. Engelhardt, F. Pausch, R. Hallmann, O. Wendler, and L. M. Sorokin, “Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis.,” *J. Cell Biol.*, vol. 153, no. 5, pp. 933–946, May 2001.
- [27] M. Glukhova, V. Koteliansky, C. Fondacci, F. Marotte, and L. Rappaport, “Laminin variants and integrin laminin receptors in developing and adult human smooth muscle.,” *Dev. Biol.*, vol. 157, no. 2, pp. 437–447, Jun. 1993.
- [28] M. J. Davis *et al.*, “Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response.,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 280, no. 4, pp. H1427–33, Apr. 2001.
- [29] N. L. Flintoff-Dye *et al.*, “Role for the $\alpha 7\beta 1$ integrin in vascular development and integrity.,” *Dev. Dyn.*, vol. 234, no. 1, pp. 11–21, Sep. 2005.
- [30] Y. Dai *et al.*, “Whole exome sequencing identified a novel DAG1 mutation in a patient with rare, mild and late age of onset muscular dystrophy-dystroglycanopathy.,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 23, no. 2, pp. 811–818, Feb. 2019.
- [31] T. Tran *et al.*, “Laminin drives survival signals to promote a contractile smooth muscle phenotype and airway hyperreactivity.,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 27, no. 10, pp. 3991–4003, Oct. 2013.
- [32] M. Cotrufo *et al.*, “Basal lamina structural alterations in human asymmetric aneurismatic aorta.,” *Eur. J. Histochem.*, vol. 49, no. 4, pp. 363–370, Dec. 2005.
- [33] M. Torres-Fonseca *et al.*, “Pathophysiology of abdominal aortic aneurysm: biomarkers and novel therapeutic targets.,” *Clin. e Investig. en Arterioscler. Publ. Of. la Soc. Esp. Arterioscler.*, vol. 31, no. 4, pp. 166–177, Jul. 2019.
- [34] E. Larsson, F. Granath, J. Swedenborg, and R. Hultgren, “More patients are treated for nonruptured abdominal aortic aneurysms, but the proportion of

- women remains unchanged.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 48, no. 4, pp. 802–807, Oct. 2008.
- [35] C. Olsson, S. Thelin, E. Ståhle, A. Ekbom, and F. Granath, "Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002.," *Circulation*, vol. 114, no. 24, pp. 2611–2618, Dec. 2006.
- [36] S. Amirbekian *et al.*, "In vivo assessment of blood flow patterns in abdominal aorta of mice with MRI: implications for AAA localization.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 297, no. 4, pp. H1290-5, Oct. 2009.
- [37] I. M. Nordon, R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson, "Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms.," *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 8, no. 2, pp. 92–102, Feb. 2011.
- [38] D. J. Ballard, G. Filardo, G. Fowkes, and J. T. Powell, "Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms.," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 4, p. CD001835, Oct. 2008.
- [39] K. A. Vardulaki, N. M. Walker, N. E. Day, S. W. Duffy, H. A. Ashton, and R. A. P. Scott, "Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm.," *BJS*, vol. 87, no. 2, pp. 195–200, Feb. 2000.
- [40] S. H. Forsdahl, K. Singh, S. Solberg, and B. K. Jacobsen, "Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001.," *Circulation*, vol. 119, no. 16, pp. 2202–2208, Apr. 2009.
- [41] K. A. Vardulaki *et al.*, "Incidence among men of asymptomatic abdominal aortic aneurysms: estimates from 500 screen detected cases.," *J. Med. Screen.*, vol. 6, no. 1, pp. 50–54, Mar. 1999.
- [42] F. A. Lederle *et al.*, "Yield of repeated screening for abdominal aortic aneurysm after a 4-year interval. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators.," *Arch. Intern. Med.*, vol. 160, no. 8, pp. 1117–1121, Apr. 2000.
- [43] J. J. Earnshaw, E. Shaw, M. R. Whyman, K. R. Poskitt, and B. P. Heather, "Screening for abdominal aortic aneurysms in men.," *BMJ*, vol. 328, no. 7448, pp. 1122 LP – 1124, May 2004.
- [44] J. F. Blanchard, "Epidemiology of Abdominal Aortic Aneurysms.," *Epidemiol. Rev.*, vol. 21, no. 2, pp. 207–221, Jul. 1999.

- [45] B. Soto, L. Vila, J. Dilmé, J.-R. Escudero, S. Bellmunt, and M. Camacho, "Finite element analysis in symptomatic and asymptomatic abdominal aortic aneurysms for aortic disease risk stratification.," *Int. Angiol.*, vol. 37, no. 6, pp. 479–485, Dec. 2018.
- [46] R. A. P. Scott, "The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial.," *Lancet*, vol. 360, no. 9345, pp. 1531–1539, Nov. 2002.
- [47] R. A. P. Scott, N. M. Wilson, H. A. Ashton, and D. N. Kay, "Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: 5-year results of a randomized controlled study.," *BJS*, vol. 82, no. 8, pp. 1066–1070, Aug. 1995.
- [48] P. E. Norman *et al.*, "Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm.," *BMJ*, vol. 329, no. 7477, p. 1259, Nov. 2004.
- [49] J. S. Lindholt, S. Juul, H. Fasting, and E. W. Henneberg, "Screening for abdominal aortic aneurysms: single centre randomised controlled trial.," *BMJ*, vol. 330, no. 7494, p. 750, Apr. 2005.
- [50] E. L. Chaikof *et al.*, "The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: The Society for Vascular Surgery practice guidelines.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 50, no. 4, pp. S2–S49, Oct. 2009.
- [51] K. A. Giles, F. B. Pomposelli, A. D. Hamdan, M. C. Wyers, and M. L. Schermerhorn, "Comparison of open and endovascular repair of ruptured abdominal aortic aneurysms from the ACS-NSQIP 2005-07.," *J. Endovasc. Ther. an Off. J. Int. Soc. Endovasc. Spec.*, vol. 16, no. 3, pp. 365–372, Jun. 2009.
- [52] G. Ailawadi, J. L. Eliason, and G. R. Upchurch Jr, "Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 38, no. 3, pp. 584–588, Sep. 2003.
- [53] P. K. Shah, "Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm.," *Circulation*, vol. 96, no. 7. United States, pp. 2115–2117, Oct-1997.
- [54] N. Sakalihasan, R. Limet, and O. D. Defawe, "Abdominal aortic aneurysm," *Lancet*, vol. 365, no. 9470, pp. 1577–1589, Apr. 2005.
- [55] A. Nollendorfs, T. C. Greiner, H. Nagase, and B. T. Baxter, "The expression and

- localization of membrane type-1 matrix metalloproteinase in human abdominal aortic aneurysms.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 34, no. 2, pp. 316–322, Aug. 2001.
- [56] G. M. Longo, W. Xiong, T. C. Greiner, Y. Zhao, N. Fiotti, and B. T. Baxter, "Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms.," *J. Clin. Invest.*, vol. 110, no. 5, pp. 625–632, Sep. 2002.
- [57] M. Orriols *et al.*, "Down-regulation of Fibulin-5 is associated with aortic dilation: role of inflammation and epigenetics.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 110, no. 3, pp. 431–442, Jun. 2016.
- [58] F. M. Davis, D. L. Rateri, and A. Daugherty, "Mechanisms of aortic aneurysm formation: translating preclinical studies into clinical therapies.," *Heart*, vol. 100, no. 19, pp. 1498–1505, Oct. 2014.
- [59] D. L. Rateri, D. A. Howatt, J. J. Moorleggen, R. Charnigo, L. A. Cassis, and A. Daugherty, "Prolonged Infusion of Angiotensin II in *ApoE*^{-/-} Mice Promotes Macrophage Recruitment with Continued Expansion of Abdominal Aortic Aneurysm.," *Am. J. Pathol.*, vol. 179, no. 3, pp. 1542–1548, Sep. 2011.
- [60] J. R. Cohen, L. Keegan, I. Sarfati, D. Danna, C. Ilardi, and L. Wise, "Neutrophil chemotaxis and neutrophil elastase in the aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysms.," *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 423–430, 1991.
- [61] X. Houard *et al.*, "Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 82, no. 3, pp. 532–541, Jun. 2009.
- [62] R. K. Middleton, M. J. Bown, G. M. Lloyd, J. L. Jones, N. J. London, and R. D. Sayers, "Characterisation of Interleukin-8 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression within the Abdominal Aortic Aneurysm and their Association with Mural Inflammation.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 37, no. 1, pp. 46–55, Jan. 2009.
- [63] S. Schubl *et al.*, "Upregulation of protein kinase cdelta in vascular smooth muscle cells promotes inflammation in abdominal aortic aneurysm.," *J. Surg. Res.*, vol. 153, no. 2, pp. 181–187, May 2009.
- [64] J. Juvonen *et al.*, "Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 11, pp. 2843–2847, Nov. 1997.
- [65] W. Xiong, J. MacTaggart, R. Knispel, J. Worth, Y. Persidsky, and B. T. Baxter,

- “Blocking TNF-alpha attenuates aneurysm formation in a murine model.,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 4, pp. 2741–2746, Aug. 2009.
- [66] K. A. Hance, M. Tataria, S. J. Ziporin, J. K. Lee, and R. W. Thompson, “Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor.,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 35, no. 2, pp. 254–261, Feb. 2002.
- [67] R. W. Thompson, S. Liao, and J. A. Curci, “Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms.,” *Coron. Artery Dis.*, vol. 8, no. 10, pp. 623–631, Oct. 1997.
- [68] A. López-Candales, D. R. Holmes, S. Liao, M. J. Scott, S. A. Wickline, and R. W. Thompson, “Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms.,” *Am. J. Pathol.*, vol. 150, no. 3, pp. 993–1007, Mar. 1997.
- [69] E. L. Henderson, Y. J. Geng, G. K. Sukhova, A. D. Whitemore, J. Knox, and P. Libby, “Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms.,” *Circulation*, vol. 99, no. 1, pp. 96–104, Jan. 1999.
- [70] J. Satta, A. Mennander, and Y. Soini, “Increased Medial TUNEL-positive Staining Associated with Apoptotic Bodies is Linked to Smooth Muscle Cell Diminution during Evolution of Abdominal Aortic Aneurysms.,” *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 16, no. 4, pp. 462–466, Jul. 2002.
- [71] L. Jiao, Z. Xu, F. Xu, S. Zhang, and K. Wu, “Vascular smooth muscle cell remodelling in elastase-induced aortic aneurysm.,” *Acta Cardiol.*, vol. 65, no. 5, pp. 499–506, Oct. 2010.
- [72] D. Yamanouchi, S. Morgan, K. Kato, J. Lengfeld, F. Zhang, and B. Liu, “Effects of Caspase Inhibitor on Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm in Apolipoprotein E-Deficient Mice.,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 30, no. 4, pp. 702–707, Apr. 2010.
- [73] A. Tsamis, J. T. Krawiec, and D. A. Vorp, “Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review.,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 10, no. 83, p. 20121004, Jun. 2013.
- [74] J. Satta, T. Juvonen, K. Haukipuro, M. Juvonen, and M. I. Kairaluoma, “Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal

- propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 22, no. 2, pp. 155–160, Aug. 1995.
- [75] G. B. Nackman, F. J. Karkowski, V. J. Halpern, H. P. Gaetz, and M. D. Tilson, "Elastin degradation products induce adventitial angiogenesis in the Anidjar/Dobrin rat aneurysm model.," *Surgery*, vol. 122, no. 1, pp. 39–44, Jul. 1997.
- [76] D. R. Holmes, S. Liao, W. C. Parks, and R. W. Thompson, "Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: a histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 21, no. 5, pp. 761–762, May 1995.
- [77] J.-F. Dilmé *et al.*, "Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.*, vol. 48, no. 4, pp. 374–381, Oct. 2014.
- [78] D. A. McDonald, "Regional pulse-wave velocity in the arterial tree.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 24, no. 1, pp. 73–78, Jan. 1968.
- [79] S. Annambhotla, S. Bourgeois, X. Wang, P. H. Lin, Q. Yao, and C. Chen, "Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation.," *World J. Surg.*, vol. 32, no. 6, pp. 976–986, Jun. 2008.
- [80] J. Stenbaek, B. Kalin, and J. Swedenborg, "Growth of thrombus may be a better predictor of rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 20, no. 5, pp. 466–469, Nov. 2000.
- [81] D. A. Vorp, D. H. Wang, M. W. Webster, and W. J. Federspiel, "Effect of intraluminal thrombus thickness and bulge diameter on the oxygen diffusion in abdominal aortic aneurysm.," *J. Biomech. Eng.*, vol. 120, no. 5, pp. 579–583, Oct. 1998.
- [82] D. A. Vorp *et al.*, "Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 34, no. 2, pp. 291–299, Aug. 2001.
- [83] E. Choke *et al.*, "A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 30, no. 3, pp. 227–244, Sep. 2005.
- [84] M. I. Patel, D. T. Hardman, C. M. Fisher, and M. Appleberg, "Current views on

- the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms.," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 181, no. 4, pp. 371–382, Oct. 1995.
- [85] I. Nordon, R. Brar, J. Taylor, R. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson, "Evidence from cross-sectional imaging indicates abdominal but not thoracic aortic aneurysms are local manifestations of a systemic dilating diathesis.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 50, no. 1, pp. 171–6.e1, Jul. 2009.
- [86] I. O. Peshkova, G. Schaefer, and E. K. Koltsova, "Atherosclerosis and aortic aneurysm - is inflammation a common denominator?," *FEBS J.*, vol. 283, no. 9, pp. 1636–1652, May 2016.
- [87] G. Greco *et al.*, "Development of a novel scoring tool for the identification of large ≥ 5 cm abdominal aortic aneurysms.," *Ann. Surg.*, vol. 252, no. 4, pp. 675–682, Oct. 2010.
- [88] K. C. Kent *et al.*, "Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 52, no. 3, pp. 539–548, Sep. 2010.
- [89] D. T. Smelser *et al.*, "Population risk factor estimates for abdominal aortic aneurysm from electronic medical records: a case control study.," *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 14, p. 174, Dec. 2014.
- [90] C. M. Wahlgren, E. Larsson, P. K. E. Magnusson, R. Hultgren, and J. Swedenborg, "Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 51, no. 1, pp. 3–7; discussion 7, Jan. 2010.
- [91] T. B. Wilmink, C. R. Quick, and N. E. Day, "The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 30, no. 6, pp. 1099–1105, Dec. 1999.
- [92] A. Knuutinen *et al.*, "Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin.," *Br. J. Dermatol.*, vol. 146, no. 4, pp. 588–594, Apr. 2002.
- [93] J. Jin *et al.*, "Novel mechanism of aortic aneurysm development in mice associated with smoking and leukocytes.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 12, pp. 2901–2909, Dec. 2012.
- [94] T. Ogata *et al.*, "The lifetime prevalence of abdominal aortic aneurysms among siblings of aneurysm patients is eightfold higher than among siblings of spouses: an analysis of 187 aneurysm families in Nova Scotia, Canada.," *J.*

- Vasc. Surg.*, vol. 42, no. 5, pp. 891–897, Nov. 2005.
- [95] E. Larsson, F. Granath, J. Swedenborg, and R. Hultgren, “A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm.,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 49, no. 1, pp. 47–50; discussion 51, Jan. 2009.
- [96] P. E. Norman and J. T. Powell, “Site specificity of aneurysmal disease.,” *Circulation*, vol. 121, no. 4, pp. 560–568, Feb. 2010.
- [97] M. S. Freiberg, A. M. Arnold, A. B. Newman, M. S. Edwards, K. L. Kraemer, and L. H. Kuller, “Abdominal aortic aneurysms, increasing infrarenal aortic diameter, and risk of total mortality and incident cardiovascular disease events: 10-year follow-up data from the Cardiovascular Health Study.,” *Circulation*, vol. 117, no. 8, pp. 1010–1017, Feb. 2008.
- [98] J. Golledge, F. van Bockxmeer, K. Jamrozik, M. McCann, and P. E. Norman, “Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm.,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 105, no. 10, pp. 1480–1484, May 2010.
- [99] J. Raffort, F. Lareyre, M. Clément, R. Hassen-Khodja, G. Chinetti, and Z. Mallat, “Diabetes and aortic aneurysm: current state of the art.,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 114, no. 13, pp. 1702–1713, Jul. 2018.
- [100] S. Shantikumar, R. Ajjan, K. E. Porter, and D. J. A. Scott, “Diabetes and the abdominal aortic aneurysm.,” *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 39, no. 2, pp. 200–207, Feb. 2010.
- [101] K. Pafili, I. Gouni-Berthold, N. Papanas, and D. P. Mikhailidis, “Abdominal aortic aneurysms and diabetes mellitus.,” *J. Diabetes Complications*, vol. 29, no. 8, pp. 1330–1336, Nov. 2015.
- [102] J. H. N. Lindeman, “The pathophysiologic basis of abdominal aortic aneurysm progression: a critical appraisal.,” *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, vol. 13, no. 7, pp. 839–851, May 2015.
- [103] M. E. Groeneveld *et al.*, “Systematic Review of Circulating, Biomechanical, and Genetic Markers for the Prediction of Abdominal Aortic Aneurysm Growth and Rupture.,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 7, no. 13, Jun. 2018.
- [104] I. Torres Courchoud and J. I. Pérez Calvo, “[Biomarkers and clinical practice].,” *Anales del sistema sanitario de Navarra*, vol. 39, no. 1. Spain, pp. 5–8, Apr-2016.
- [105] W. R. W. Wilson, M. Anderton, E. C. Choke, J. Dawson, I. M. Loftus, and M. M.

- Thompson, "Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 35, no. 5, pp. 580–584, May 2008.
- [106] D. Flondell-Site, B. Lindblad, T. Kolbel, and A. Gottsater, "Markers of proteolysis, fibrinolysis, and coagulation in relation to size and growth rate of abdominal aortic aneurysms.," *Vasc. Endovascular Surg.*, vol. 44, no. 4, pp. 262–268, May 2010.
- [107] J. Golledge, R. Muller, P. Clancy, M. McCann, and P. E. Norman, "Evaluation of the diagnostic and prognostic value of plasma D-dimer for abdominal aortic aneurysm.," *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 3, pp. 354–364, Feb. 2011.
- [108] S. Kasashima, Y. Zen, A. Kawashima, M. Endo, Y. Matsumoto, and F. Kasashima, "A new clinicopathological entity of IgG4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 49, no. 5, pp. 1264–71; discussion 1271, May 2009.
- [109] P. Ramos-Mozo *et al.*, "Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm.," *Atherosclerosis*, vol. 220, no. 2, pp. 552–556, Feb. 2012.
- [110] B. Soto *et al.*, "Circulating CCL20 as a New Biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm.," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 17331, Dec. 2017.
- [111] S. Urbonavicius, G. Urbonaviciene, B. Honore, E. W. Henneberg, H. Vorum, and J. S. Lindholt, "Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture--a systematic review.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 36, no. 3, pp. 272–273, Sep. 2008.
- [112] F. Biancari, M. Mosorin, V. Anttila, J. Satta, J. Juvonen, and T. Juvonen, "Ten-year outcome of patients with very small abdominal aortic aneurysm.," *Am. J. Surg.*, vol. 183, no. 1, pp. 53–55, Jan. 2002.
- [113] J. S. Lindholt, N. H. Heegaard, S. Vammen, H. Fasting, E. W. Henneberg, and L. Heickendorff, "Smoking, but not lipids, lipoprotein(a) and antibodies against oxidised LDL, is correlated to the expansion of abdominal aortic aneurysms.," *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, vol. 21, no. 1, pp. 51–56, Jan. 2001.
- [114] Propranolol Aneurysm Trial Investigators, "Propranolol for small abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 35, no. 1, pp. 72–79, Jan. 2002.
- [115] J. S. Lindholt, E. W. Henneberg, S. Juul, and H. Fasting, "Impaired results of a

- randomised double blinded clinical trial of propranolol versus placebo on the expansion rate of small abdominal aortic aneurysms.," *Int. Angiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 52–57, Mar. 1999.
- [116] J. Garcia-Prieto *et al.*, "Neutrophil stunning by metoprolol reduces infarct size.," *Nat. Commun.*, vol. 8, p. 14780, Apr. 2017.
- [117] A. T. Hirsch *et al.*, "ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Associations for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society.," *J. Vasc. Interv. Radiol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1383–97; quiz 1398, Sep. 2006.
- [118] A. R. Brady, S. G. Thompson, F. G. R. Fowkes, R. M. Greenhalgh, and J. T. Powell, "Abdominal aortic aneurysm expansion: Risk factors and time intervals for surveillance.," *Circulation*, vol. 110, no. 1, pp. 16–21, Jun. 2004.
- [119] K. E. Kristensen, C. Torp-Pedersen, G. H. Gislason, M. Egfjord, H. B. Rasmussen, and P. R. Hansen, "Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers in patients with abdominal aortic aneurysms: nation-wide cohort study.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 3, pp. 733–740, Mar. 2015.
- [120] M. J. Sweeting, S. G. Thompson, L. C. Brown, R. M. Greenhalgh, and J. T. Powell, "Use of angiotensin converting enzyme inhibitors is associated with increased growth rate of abdominal aortic aneurysms.," *J. Vasc. Surg.*, vol. 52, no. 1, pp. 1–4, Jul. 2010.
- [121] C. J. Railton, J. Wolpin, J. Lam-McCulloch, and S. E. Belo, "Renin-angiotensin blockade is associated with increased mortality after vascular surgery.," *Can. J. Anaesth.*, vol. 57, no. 8, pp. 736–744, Aug. 2010.
- [122] C. D. Bicknell, G. Kiru, E. Falaschetti, J. T. Powell, and N. R. Poulter, "An evaluation of the effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the growth rate of small abdominal aortic aneurysms: a randomized placebo-controlled trial (AARDVARK).," *Eur. Heart J.*, vol. 37, no. 42, pp. 3213–3221, Nov. 2016.
- [123] N. Tomita *et al.*, "Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm progression by nifedipine.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 239–244, Feb. 2008.
- [124] A. B. M. Wilmink *et al.*, "Are antihypertensive drugs associated with

- abdominal aortic aneurysms?.,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 36, no. 4, pp. 751–757, Oct. 2002.
- [125] J. A. Curci, D. Petrinec, S. Liao, L. M. Golub, and R. W. Thompson, “Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: A comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 28, no. 6, pp. 1082–1093, Dec. 1998.
- [126] A. K. Prall *et al.*, “Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 35, no. 5, pp. 923–929, May 2002.
- [127] C. A. Meijer, T. Stijnen, M. N. J. M. Wasser, J. F. Hamming, J. H. van Bockel, and J. H. N. Lindeman, “Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 159, no. 12, pp. 815–823, Dec. 2013.
- [128] E. F. Steinmetz *et al.*, “Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice,” *Ann. Surg.*, vol. 241, no. 1, pp. 92–101, Jan. 2005.
- [129] W. F. Johnston *et al.*, “Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1beta signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 2, pp. 294–304, Feb. 2013.
- [130] R. Batra *et al.*, “IL-1beta (Interleukin-1beta) and TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor-alpha) Impact Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Differential Effects on Macrophage Polarization,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 38, no. 2, pp. 457–463, Feb. 2018.
- [131] J. L. Martin-Ventura *et al.*, “Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms,” *Atherosclerosis*, vol. 214, no. 2, pp. 486–489, Feb. 2011.
- [132] C. Tarin *et al.*, “Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis or Fn14 deficiency reduce elastase perfusion-induced aortic abdominal aneurysm in mice,” *J. Am. Heart Assoc.*, vol. 3, no. 4, Aug. 2014.
- [133] M. Camacho *et al.*, “Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm,” *J. Lipid Res.*, vol. 54, no. 12, pp. 3506–3515, Dec. 2013.
- [134] U. Yokoyama *et al.*, “Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm

- formation.," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, p. e36724, May 2012.
- [135] C.-E. Fernandez-Garcia *et al.*, "Increased galectin-3 levels are associated with abdominal aortic aneurysm progression and inhibition of galectin-3 decreases elastase-induced AAA development.," *Clin. Sci. (Lond).*, vol. 131, no. 22, pp. 2707–2719, Nov. 2017.
- [136] H. Li *et al.*, "Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets.," *J. Immunol. Res.*, vol. 2018, p. 7213760, Jun. 2018.
- [137] F. M. Davis, D. L. Rateri, and A. Daugherty, "Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies.," *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 30, no. 6, pp. 566–573, Nov. 2015.
- [138] J. Raffort, F. Lareyre, M. Clement, and Z. Mallat, "Micro-RNAs in abdominal aortic aneurysms: insights from animal models and relevance to human disease.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 110, no. 2, pp. 165–177, May 2016.
- [139] M. Galán *et al.*, "Induction of histone deacetylases (HDACs) in human abdominal aortic aneurysm: therapeutic potential of HDAC inhibitors.," *Dis. Model. Mech.*, vol. 9, no. 5, pp. 541–552, May 2016.
- [140] X. Fu, A. Yamawaki-Ogata, H. Oshima, Y. Ueda, A. Usui, and Y. Narita, "Intravenous administration of mesenchymal stem cells prevents angiotensin II-induced aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mouse.," *J. Transl. Med.*, vol. 11, no. 1, p. 175, Jul. 2013.
- [141] S. K. Wang *et al.*, "Rationale and Design of the ARREST Trial Investigating Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Small Abdominal Aortic Aneurysm.," *Ann. Vasc. Surg.*, vol. 47, pp. 230–237, Feb. 2018.
- [142] J. M. Lehmann, B. Holzmann, E. W. Breitbart, P. Schmiegelow, G. Riethmuller, and J. P. Johnson, "Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000.," *Cancer Res.*, vol. 47, no. 3, pp. 841–845, Feb. 1987.
- [143] Z. Wang and X. Yan, "CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion.," *Cancer Lett.*, vol. 330, no. 2, pp. 150–162, Apr. 2013.
- [144] J. M. Lehmann, G. Riethmuller, and J. P. Johnson, "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily.," *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 24, pp. 9891–9895, Dec. 1989.
- [145] I. M. Shih, D. E. Elder, M. Y. Hsu, and M. Herlyn, "Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes.," *Am. J. Pathol.*, vol. 145, no. 4, pp. 837–845, Oct. 1994.
- [146] I. M. Shih, D. E. Elder, D. Speicher, J. P. Johnson, and M. Herlyn, "Isolation and functional characterization of the A32 melanoma-associated antigen.," *Cancer Res.*, vol. 54, no. 9, pp. 2514–2520, May 1994.
- [147] M. Luca, B. Hunt, C. D. Bucana, J. P. Johnson, I. J. Fidler, and M. Bar-Eli, "Direct correlation between MUC18 expression and metastatic potential of human melanoma cells.," *Melanoma Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 35–41, Feb. 1993.
- [148] M. M. Rummel, C. Sers, and J. P. Johnson, "Phorbol ester and cyclic AMP-mediated regulation of the melanoma-associated cell adhesion molecule MUC18/MCAM.," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 9, pp. 2218–2223, May 1996.
- [149] S. Xie *et al.*, "Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 57, no. 11, pp. 2295–2303, Jun. 1997.
- [150] G.-J. Wu, M.-W. H. Wu, C. Wang, and Y. Liu, "Enforced expression of METCAM/MUC18 increases tumorigenesis of human prostate cancer LNCaP cells in nude mice.," *J. Urol.*, vol. 185, no. 4, pp. 1504–1512, Apr. 2011.
- [151] N. Bardin, V. Frances, G. Lesaule, N. Horschowski, F. George, and J. Sampol, "Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 218, no. 1, pp. 210–216, Jan. 1996.
- [152] A. S. Leroyer, M. G. Blin, R. Bachelier, N. Bardin, M. Blot-Chabaud, and F. Dignat-George, "CD146 (Cluster of Differentiation 146).," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 39, no. 6, pp. 1026–1033, Jun. 2019.
- [153] J. Stalin, L. Vivancos, N. Bardin, F. Dignat-Georges, and M. Blot-Chabaud, "MCAM and its Isoforms as Novel Targets in Angiogenesis Research and Therapy.," in *Physiologic and Pathologic Angiogenesis-Signaling Mechanism and Targeted Therapy*, D. Simionescu and A. Simionescu, Eds. Noerdestedt:BoD-Books on Demand, 2017, pp. 429-450.
- [154] C. Sers, K. Kirsch, U. Rothbacher, G. Riethmüller, and J. P. Johnson, "Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A., vol. 90, no. 18, pp. 8514–8518, Sep. 1993.
- [155] C. Sers, G. Riethmuller, and J. P. Johnson, “MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread.,” *Cancer Res.*, vol. 54, no. 21, pp. 5689–5694, Nov. 1994.
- [156] D. Jean *et al.*, “Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 26, pp. 16501–16508, Jun. 1998.
- [157] C. S. Mintz-Weber and J. P. Johnson, “Identification of the elements regulating the expression of the cell adhesion molecule MCAM/MUC18. Loss of AP-2 is not required for MCAM expression in melanoma cell lines.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 44, pp. 34672–34680, Nov. 2000.
- [158] K. Kohama *et al.*, “Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene.,” *Neurochem. Int.*, vol. 46, no. 6, p. 465–470, May 2005.
- [159] O. Vainio, D. Dunon, F. Aïssi, J. P. Dangy, K. M. McNagny, and B. A. Imhof, “HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit⁺ hemopoietic progenitors.,” *J. Cell Biol.*, vol. 135, no. 6 Pt 1, pp. 1655–1668, Dec. 1996.
- [160] G. Feng *et al.*, “CD146 Promoter Polymorphism (rs3923594) Is Associated with Recurrence of Clear Cell Renal Cell Carcinoma in Chinese Population.,” *Dis. Markers*, vol. 2017, p. 2543059, May 2017.
- [161] X. Lei, C.-W. Guan, Y. Song, and H. Wang, “The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression.,” *Cancer Cell Int.*, vol. 15, no. 1, p. 3, Feb. 2015.
- [162] J. P. Johnson, U. Rothbacher, and C. Sers, “The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family.,” *Melanoma Res.*, vol. 3, no. 5, Oct. 1993.
- [163] M. Schon, T. Kahne, H. Gollnick, and M. P. Schon, “Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM).,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 125, no. 2, pp. 353–363, Aug. 2005.
- [164] E. Taira *et al.*, “Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 48, pp. 28681–28687, Dec. 1995.

- [165] J. Stalin, M. Nollet, F. Dignat-George, N. Bardin, and M. Blot-Chabaud, "Therapeutic and Diagnostic Antibodies to CD146: Thirty Years of Research on Its Potential for Detection and Treatment of Tumors.," *Antibodies*, vol. 6, p. 17, Nov. 2017.
- [166] N. Bardin, V. Frances, V. Combes, J. Sampol, and F. Dignat-George, "CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells.," *FEBS Lett.*, vol. 421, no. 1, pp. 12–14, Jan. 1998.
- [167] N. Bardin *et al.*, "Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease.," *Inflamm. Bowel Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 16–21, Jan. 2006.
- [168] N. Bardin *et al.*, "CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 5, pp. 746–753, May 2009.
- [169] E.-M. Boneberg, H. Illges, D. F. Legler, and G. Furstenberger, "Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process.," *Microvasc. Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 325–331, Dec. 2009.
- [170] W. F. Pickl *et al.*, "MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 158, no. 5, pp. 2107–2115, Mar. 1997.
- [171] Z. Ye *et al.*, "Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2803, Dec. 2013.
- [172] E. Taira, K. Kohama, Y. Tsukamoto, S. Okumura, and N. Miki, "Characterization of Gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 198, no. 3, pp. 377–387, Mar. 2004.
- [173] Y. Tsukamoto *et al.*, "Adhesive activity of gicerin, a cell-adhesion molecule, in kidneys and nephroblastomas of chickens.," *Cell Tissue Res.*, vol. 292, no. 1, pp. 137–142, Apr. 1998.
- [174] K. C. Russell, D. G. Phinney, M. R. Lacey, B. L. Barrilleaux, K. E. Meyertholen, and K. C. O'Connor, "In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment.," *Stem Cells*, vol. 28, no. 4, pp. 788–798, Apr. 2010.
- [175] N. Espagnolle, F. Guilloton, F. Deschaseaux, M. Gadelorge, L. Sensébé, and P. Bourin, "CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their

- vascular smooth muscle commitment.," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 104–114, Jan. 2014.
- [176] D. Baksh, R. Yao, and R. S. Tuan, "Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow.," *Stem Cells*, vol. 25, no. 6, pp. 1384–1392, Jun. 2007.
- [177] F. Anfosso *et al.*, "Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK).," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 41, pp. 26852–26856, Oct. 1998.
- [178] F. Anfosso, N. Bardin, E. Vivier, F. Sabatier, J. Sampol, and F. Dignat-George, "Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 2, pp. 1564–1569, Jan. 2001.
- [179] G. Li *et al.*, "Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma.," *Oncogene*, vol. 22, no. 44, pp. 6891–6899, Oct. 2003.
- [180] M. Zigler *et al.*, "Expression of Id-1 is regulated by MCAM/MUC18: a missing link in melanoma progression.," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 10, pp. 3494–3504, May 2011.
- [181] A. Kebir *et al.*, "CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo.," *Circ. Res.*, vol. 107, no. 1, pp. 66–75, Jul. 2010.
- [182] Y. Kang, F. Wang, J. Feng, D. Yang, X. Yang, and X. Yan, "Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells.," *Cell Res.*, vol. 16, no. 3, pp. 313–318, Mar. 2006.
- [183] Q. Zeng *et al.*, "Impaired tumor angiogenesis and VEGF-induced pathway in endothelial CD146 knockout mice.," *Protein Cell*, vol. 5, no. 6, pp. 445–456, Jun. 2014.
- [184] T. Tu *et al.*, "CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development.," *Cell Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 275–287, Mar. 2015.
- [185] T. Jiang *et al.*, "CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis.," *Blood*, vol. 120, no. 11, pp. 2330–2339, Sep. 2012.
- [186] X. Yan *et al.*, "A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth.," *Blood*, vol. 102, no. 1, pp. 184–191, Jul.

2003.

- [187] Q. Zeng *et al.*, "CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, pp. 1127–1132, Jan. 2012.
- [188] Y. Luo *et al.*, "Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration.," *Oncogene*, vol. 31, no. 3, pp. 306–321, Jan. 2012.
- [189] S. Yoshioka, H. Fujiwara, T. Higuchi, S. Yamada, M. Maeda, and S. Fujii, "Melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) is expressed on human luteinizing granulosa cells: enhancement of its expression by hCG, interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha.," *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 9, no. 6, pp. 311–319, Jun. 2003.
- [190] G. C. Simon *et al.*, "Up-regulation of MUC18 in airway epithelial cells by IL-13: implications in bacterial adherence.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 44, no. 5, pp. 606–613, May 2011.
- [191] X.-Q. Zhang, J.-J. Dong, T. Cai, X. Shen, X.-J. Zhou, and L. Liao, "High glucose induces apoptosis via upregulation of Bim expression in proximal tubule epithelial cells.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 15, pp. 24119–24129, Apr. 2017.
- [192] C. R. Mangahas, G. V dela Cruz, R. J. Schneider, and S. Jamal, "Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 123, no. 6, pp. 1135–1139, Dec. 2004.
- [193] S. Tsuchiya, Y. Tsukamoto, E. Taira, and J. LaMarre, "Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 19, no. 3, pp. 381–386, Mar. 2007.
- [194] S. Hiroi, E. Taira, K. Ogawa, and Y. Tsukamoto, "Neurite extension of DRG neurons by gicerin expression is enhanced by nerve growth factor.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 16, no. 6, pp. 1009–1014, Dec. 2005.
- [195] E. Taira, K. Kohama, Y. Tsukamoto, S. Okumura, and N. Miki, "Gicerin/CD146 is involved in neurite extension of NGF-treated PC12 cells.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 2, pp. 632–637, Aug. 2005.
- [196] P. Wang *et al.*, "MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 33, no. 18, pp. 3689–3699, Sep. 2013.

- [197] H.-F. Wang *et al.*, "miR-573 regulates melanoma progression by targeting the melanoma cell adhesion molecule.," *Oncol. Rep.*, vol. 30, no. 1, pp. 520–526, Jul. 2013.
- [198] M. G. Blin *et al.*, "CD146 deficiency promotes plaque formation in a mouse model of atherosclerosis by enhancing RANTES secretion and leukocyte recruitment.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 130, no. March, pp. 76–87, May 2019.
- [199] J. Middleton *et al.*, "A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146.," *J. Pathol.*, vol. 206, no. 3, pp. 260–268, Jul. 2005.
- [200] M. Neidhart, R. Wehrli, P. Brühlmann, B. A. Michel, R. E. Gay, and S. Gay, "Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis.," *Arthritis Rheum.*, vol. 42, no. 4, p. 622–630, Apr. 1999.
- [201] C. Schulz *et al.*, "Upregulation of MCAM in primary bronchial epithelial cells from patients with COPD.," *Eur. Respir. J.*, vol. 22, no. 3, pp. 450–456, Sep. 2003.
- [202] P. K. Dagur *et al.*, "MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases.," *J. Autoimmun.*, vol. 37, no. 4, pp. 319–327, Dec. 2011.
- [203] B. Guezguez, P. Vigneron, N. Lamerant, C. Kieda, T. Jaffredo, and D. Dunon, "Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor.," *J. Immunol.*, vol. 179, no. 10, pp. 6673–6685, Nov. 2007.
- [204] N. Despoix *et al.*, "Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 38, no. 10, pp. 2855–2864, Oct. 2008.
- [205] A. Schrage *et al.*, "Murine CD146 is widely expressed on endothelial cells and is recognized by the monoclonal antibody ME-9F1.," *Histochem. Cell Biol.*, vol. 129, no. 4, pp. 441–451, Apr. 2008.
- [206] K. Harhour *et al.*, "Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia.," *Blood*, vol. 115, no. 18, pp. 3843–3851, May 2010.
- [207] Y.-N. Qian *et al.*, "Adhesion molecule CD146 and its soluble form correlate well

- with carotid atherosclerosis and plaque instability.," *CNS Neurosci. Ther.*, vol. 20, no. 5, pp. 438–445, May 2014.
- [208] S. Ciftci Dogansen, A. Helvacı, M. Adas, and S. Deniz Onal, "The relationship between early atherosclerosis and endothelial dysfunction in type 1 diabetic patients as evidenced by measurement of carotid intima-media thickness and soluble CD146 levels: a cross sectional study.," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 12, p. 153, Oct. 2013.
- [209] Y. Luo *et al.*, "Macrophagic CD146 promotes foam cell formation and retention during atherosclerosis.," *Cell Res.*, vol. 27, no. 3, pp. 352–372, Mar. 2017.
- [210] R. Shayesteh-Kheslat *et al.*, "Proangiogenic potency of MUC18 in arteriosclerotic disease.," *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)*, vol. 56, no. 3, pp. 409–415, Jun. 2015.
- [211] N. Shi and S.-Y. Chen, "Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation.," *J. Biomed. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 40–46, Jan. 2014.
- [212] M. A. Dale, M. K. Ruhlman, and B. T. Baxter, "Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, no. 8, pp. 1746–1755, Aug. 2015.
- [213] Y. J. Geng, Q. Wu, M. Muszynski, G. K. Hansson, and P. Libby, "Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 19–27, Jan. 1996.
- [214] F. A. Oberhammer, K. Hochegger, G. Fröschl, R. Tiefenbacher, and M. Pavelka, "Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase.," *J. Cell Biol.*, vol. 126, no. 4, pp. 827–837, Aug. 1994.
- [215] B. Yue, "Biology of the extracellular matrix: an overview.," *J. Glaucoma*, vol. 23, no. 8 Suppl 1, pp. S20-3, Oct. 2014.
- [216] A. Didangelos *et al.*, "Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 8, p. M111.008128, Aug. 2011.
- [217] H. Kuivaniemi, E. J. Ryer, J. R. Elmore, and G. Tromp, "Understanding the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms.," *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*,

- vol. 13, no. 9, pp. 975–987, Aug. 2015.
- [218] S. Yoon, G. Tromp, S. Vongpunsawad, A. Ronkainen, T. Juvonen, and H. Kuivaniemi, “Genetic analysis of MMP3, MMP9, and PAI-1 in Finnish patients with abdominal aortic or intracranial aneurysms.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 265, no. 2, pp. 563–568, Nov. 1999.
- [219] C. M. Brophy, W. H. Marks, J. M. Reilly, and M. D. Tilson, “Decreased tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in abdominal aortic aneurysm tissue: a preliminary report.,” *J. Surg. Res.*, vol. 50, no. 6, pp. 653–657, Jun. 1991.
- [220] K. M. Newman *et al.*, “Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm.,” *Arterioscler. Thromb. a J. Vasc. Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 1315–1320, Aug. 1994.
- [221] N. Sakalihan, P. Delvenne, B. V Nusgens, R. Limet, and C. M. Lapière, “Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms.,” *J. Vasc. Surg.*, vol. 24, no. 1, pp. 127–133, Jul. 1996.
- [222] J. Saus, S. Quinones, Y. Otani, H. Nagase, E. D. J. Harris, and M. Kurkinen, “The complete primary structure of human matrix metalloproteinase-3. Identity with stromelysin.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 14, pp. 6742–6745, May 1988.
- [223] G. S. Herron, M. J. Banda, E. J. Clark, J. Gavrilovic, and Z. Werb, “Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 6, pp. 2814–2818, Feb. 1986.
- [224] C. Wu *et al.*, “Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain.,” *Nat. Med.*, vol. 15, no. 5, pp. 519–527, May 2009.
- [225] A. D. Theocharis, I. Tsolakis, T. Tsegenidis, and N. K. Karamanos, “Human abdominal aortic aneurysm is closely associated with compositional and specific structural modifications at the glycosaminoglycan level.,” *Atherosclerosis*, vol. 145, no. 2, pp. 359–368, Aug. 1999.
- [226] R. Kowalewski, K. Sobolewski, A. Małkowski, M. Wolańska, and M. Gacko, “Evaluation of enzymes involved in proteoglycan degradation in the wall of abdominal aortic aneurysms.,” *J. Vasc. Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 95–100, Jan. 2006.
- [227] A. D. Theocharis, D. A. Theocharis, G. De Luca, A. Hjerpe, and N. K. Karamanos, “Compositional and structural alterations of chondroitin and dermatan

- sulfates during the progression of atherosclerosis and aneurysmal dilatation of the human abdominal aorta.," *Biochimie*, vol. 84, no. 7, pp. 667–674, Jul. 2002.
- [228] T. N. Wight, "Cell biology of arterial proteoglycans.," *Arteriosclerosis*, vol. 9, no. 1, pp. 1–20, Jan. 1989.
- [229] M. Durbeej, M. D. Henry, M. Ferletta, K. P. Campbell, and P. Ekblom, "Distribution of Dystroglycan in Normal Adult Mouse Tissues.," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 46, no. 4, pp. 449–457, Apr. 1998.
- [230] H. Hosokawa, H. Ninomiya, Y. Kitamura, K. Fujiwara, and T. Masaki, "Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis.," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 7, pp. 1487–1496, Apr. 2002.
- [231] C. M. Kelleher, S. E. McLean, and R. P. Mecham, "Vascular extracellular matrix and aortic development.," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 153–188, 2004.
- [232] J. Song *et al.*, "Endothelial Basement Membrane Laminin 511 Contributes to Endothelial Junctional Tightness and Thereby Inhibits Leukocyte Transmigration.," *Cell Rep.*, vol. 18, no. 5, pp. 1256–1269, Jan. 2017.
- [233] L. M. Sorokin, F. Pausch, M. Frieser, S. Kröger, E. Ohage, and R. Deutzmann, "Developmental regulation of the laminin alpha5 chain suggests a role in epithelial and endothelial cell maturation.," *Dev. Biol.*, vol. 189, no. 2, pp. 285–300, Sep. 1997.
- [234] T. Tran *et al.*, "Laminin-binding integrin alpha7 is required for contractile phenotype expression by human airway myocytes.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 37, no. 6, pp. 668–680, Dec. 2007.
- [235] Y. Li *et al.*, "S100A4(+) Macrophages Are Necessary for Pulmonary Fibrosis by Activating Lung Fibroblasts.," *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1776, Aug. 2018.
- [236] P. Kong, P. Christia, A. Saxena, Y. Su, and N. G. Frangogiannis, "Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis.," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 305, no. 9, pp. H1363-72, Nov. 2013.
- [237] J. Cao *et al.*, "Spatiotemporal Expression of Matrix Metalloproteinases (MMPs) is Regulated by the Ca²⁺-Signal Transducer S100A4 in the Pathogenesis of Thoracic Aortic Aneurysm.," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e70057, Jul. 2013.
- [238] F. Zhang *et al.*, "Anti-receptor for advanced glycation end products therapies

- as novel treatment for abdominal aortic aneurysm.," *Ann. Surg.*, vol. 250, no. 3, pp. 416–423, Sep. 2009.
- [239] K. Tamama, C. K. Sen, and A. Wells, "Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the smooth muscle lineage by blocking ERK/MAPK signaling pathway.," *Stem Cells Dev.*, vol. 17, no. 5, pp. 897–908, Oct. 2008.
- [240] C. P. Mack, "Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1495–1505, Jul. 2011.
- [241] R. van der Zee, T. Murohara, J. Passeri, M. Kearney, D. A. Cheresch, and J. M. Isner, "Reduced intimal thickening following alpha(v)beta3 blockade is associated with smooth muscle cell apoptosis.," *Cell Adhes. Commun.*, vol. 6, no. 5, pp. 371–379, 1998.
- [242] J. Golledge, P. S. Tsao, R. L. Dalman, and P. E. Norman, "Circulating markers of abdominal aortic aneurysm presence and progression.," *Circulation*, vol. 118, no. 23, pp. 2382–2392, Dec. 2008.