



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Papel de Galectina-3 y Lipocalina-2 en la  
respuesta inflamatoria implicada en el  
remodelado vascular patológico**

**Carlos Ernesto Fernández García  
Madrid, 2017**

**DIRECTORES:  
DR. JOSÉ LUIS MARTÍN VENTURA  
DR. JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS**

**LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL Y  
PATOLOGÍA VASCULAR  
IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**PAPEL DE GALECTINA-3 Y LIPOCALINA-2 EN LA  
RESPUESTA INFLAMATORIA IMPLICADA EN EL  
REMODELADO VASCULAR PATOLÓGICO**

Memoria que presenta el Licenciado en Bioquímica Carlos Ernesto Fernández García para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directores de tesis:

Dr. José Luis Martín Ventura y Dr. Jesús Egido de los Ríos

Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz,

Universidad Autónoma de Madrid







Don José Luis Martín Ventura, Profesor contratado doctor de la Universidad Autónoma de Madrid y Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

#### CERTIFICAN

Que Don Carlos Ernesto Fernández García, Licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el laboratorio de Nefrología Experimental y Patología Vascolar de la Fundación Jiménez Díaz, bajo su dirección, la presente tesis doctoral, titulada “Papel de Galectina-3 y Lipocalina-2 en la respuesta inflamatoria implicada en el remodelado vascular patológico “

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 21 de Diciembre de 2016

Los directores de tesis:

Dr. José Luis Martín Ventura

Dr. Jesús Egido de los Rios



## RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es una de las primeras causas de mortalidad, y en la mayoría de los casos, la aterotrombosis es la causa subyacente. Tanto la aterosclerosis como los aneurismas de aorta abdominal (AAA) son enfermedades que comparten mecanismos fisiopatológicos comunes como la inflamación, el estrés oxidativo, la proteólisis, la muerte celular o la neoangiogénesis, y cuya patogenia no se comprende completamente. Esta tesis estudia dos mediadores inflamatorios, galectina-3 (Gal-3) y lipocalina-2 (Lcn2), así como su ortólogo humano, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), cuyos roles como biomarcadores y/o dianas terapéuticas en aterosclerosis y AAA aún no están completamente definidos.

Hemos demostrado que la expresión y secreción de Gal-3 se incrementa durante la diferenciación monocito-macrófago, en un proceso mediado por la producción de especies reactivas de oxígeno y liberación de exosomas. Las concentraciones plasmáticas de Gal-3 se correlacionaron con la producción de ion superóxido y con el grosor íntima-media (IMT), reflejando una asociación con la aterosclerosis subclínica. Además, las concentraciones de Gal-3 se encontraron incrementadas en pacientes con aterosclerosis carotídea, y predijeron la mortalidad a 5 años en una población de enfermedad arterial periférica (PAD).

Asimismo, observamos que la concentración plasmática de Gal-3 también estaba incrementada en una cohorte de pacientes con AAA. Los estudios histológicos mostraron que la expresión de Gal-3 se produce en la pared vascular de AAA asociada a células fagocíticas y células de músculo liso vascular (CMLV). La inhibición farmacológica de Gal-3 mediante el compuesto *modified citrus pectin* (MCP) en un modelo de AAA experimental murino inducido por perfusión de elastasa produjo una reducción del diámetro aórtico, asociada a una mayor conservación de las capas de elastina y CMLV. El efecto beneficioso de la inhibición farmacológica de Gal-3 parece estar mediado por la disminución en el reclutamiento de monocitos, posiblemente relacionado con la disminución de la expresión de la quimioquina CCL-2.

Por otra parte, la presencia de Lcn2/NGAL está incrementada en la pared vascular patológica del AAA humano y murino. Hemos analizado el efecto de la delección génica y del bloqueo de Lcn2 mediante un anticuerpo (inyectado de forma preventiva o terapéutica) en un modelo murino de AAA experimental. Ambas aproximaciones produjeron una reducción del diámetro aórtico, asociado con una mayor conservación de las capas de elastina y CMLV. El efecto protector de la delección o bloqueo de Lcn2 estuvo mediado por un menor reclutamiento de neutrófilos. Asimismo, los neutrófilos obtenidos de ratones deficientes en Lcn2 mostraron una menor capacidad migratoria en experimentos *in vitro*.

Podemos concluir que tanto Gal-3 como Lcn2/NGAL son marcadores de aterotrombosis, que reflejan mecanismos patológicos subyacentes a la enfermedad vascular, principalmente la respuesta inflamatoria. Además, su modulación terapéutica podría tener una aplicabilidad clínica, que necesitaría ser refrendada por otros estudios.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1</b>	<b>Aterotrombosis.....</b>	<b>15</b>
1.1	Aterosclerosis .....	16
1.2	Aneurisma de aorta abdominal .....	18
<b>2</b>	<b>Mecanismos implicados en el remodelado vascular patológico.....</b>	<b>22</b>
2.1	Estrés oxidativo.....	23
2.2	Inflamación .....	25
2.3	Proteólisis .....	29
2.4	Muerte celular.....	31
2.5	Neoangiogénesis .....	32
<b>3</b>	<b>Biomarcadores.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>Microvesículas .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>Galectina-3 .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) .....</b>	<b>39</b>
	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>1</b>	<b>Pacientes.....</b>	<b>47</b>
1.1	Sujetos asintomáticos.....	47
1.2	Pacientes con aterosclerosis carotídea.....	49
1.3	Pacientes con PAD .....	50
1.4	Pacientes con AAA .....	52
<b>2</b>	<b>Muestras de tejido humano .....</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>Ratones.....</b>	<b>54</b>
3.1	Inducción del AAA experimental.....	55
3.2	Inhibición de Gal-3 .....	56
3.3	Inhibición de Lcn2 .....	56
3.4	Generación y purificación del anticuerpo policlonal anti-Lcn2 .....	58

<b>4</b>	<b>Cultivos celulares</b> .....	<b>58</b>
4.1	Líneas celulares.....	58
4.2	Cultivos primarios.....	59
<b>5</b>	<b>Análisis histológico</b> .....	<b>60</b>
5.1	Tinciones .....	60
5.2	Análisis histomorfométrico .....	60
5.3	Inmunohistoquímica .....	60
5.4	Inmunofluorescencia.....	62
<b>6</b>	<b>Análisis de la expresión génica</b> .....	<b>62</b>
6.1	SYBR Green .....	62
6.2	Sondas Taqman .....	63
<b>7</b>	<b>Análisis de proteínas</b> .....	<b>64</b>
7.1	Western blot.....	64
7.2	ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).....	65
<b>8</b>	<b>Aislamiento y caracterización de exosomas</b> .....	<b>65</b>
8.1	Aislamiento.....	65
8.2	Análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA).....	66
8.3	Microscopía electrónica .....	67
8.4	Marcadores proteicos.....	67
<b>9</b>	<b>Determinación de la producción de anión superóxido</b> .....	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Tomografía molecular fluorescente (FMT)</b> .....	<b>68</b>
<b>11</b>	<b>Ensayos de quimiotaxis</b> .....	<b>68</b>
<b>12</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>69</b>

## **RESULTADOS**

<b>1</b>	<b>Gal-3 se expresa en monocitos humanos y es liberada mediante exosomas en condiciones de estrés oxidativo</b> .....	<b>73</b>
<b>2</b>	<b>Los niveles plasmáticos de Gal-3 se correlacionan con la etiología de la aterosclerosis en sujetos asintomáticos</b> .....	<b>75</b>
<b>3</b>	<b>Los niveles plasmáticos de Gal-3 se encuentran incrementados en pacientes con aterosclerosis carotídea</b> .....	<b>78</b>

4	Los niveles circulantes de Gal-3 en pacientes con PAD se asocian al riesgo de mortalidad cardiovascular.....	80
5	Los niveles circulantes de Gal-3 en pacientes con AAA se asocian a la presencia y a la progresión de la enfermedad.....	82
6	Los macrófagos y CMLV de la pared patológica de AAA expresan Gal-3.....	85
7	Los niveles circulantes de Gal-3 aumentan tras la inducción del AAA por elastasa .....	87
8	El tratamiento con <i>modified citrus pectin</i> (MCP) disminuye la progresión del AAA inducido por elastasa .....	87
9	El tratamiento con MCP disminuye el infiltrado monocitario y la expresión de CCL-2 en el AAA inducido por elastasa .....	89
10	NGAL/Lcn2 está sobreexpresado en AAA humano y murino inducido por elastasa .....	91
11	La deficiencia de Lcn2 disminuye el desarrollo y el crecimiento del AAA inducido por elastasa .....	94
12	El tratamiento de ratones WT con un anticuerpo anti-Lcn2 limita la expansión del AAA inducido por elastasa.....	96
13	La deficiencia de Lcn2 o su inhibición mediante anti-Lcn2 disminuye la infiltración de neutrófilos y la actividad de metaloproteinasas .....	98
14	El tratamiento terapéutico con anti-Lcn2 reduce la progresión de los AAA inducidos por elastasa.....	102

## DISCUSIÓN

1	Biomarcadores circulantes de aterotrombosis .....	107
1.1	Galectina-3 .....	107
2	Nuevas dianas terapéuticas en AAA.....	111
2.1	Galectina-3 .....	111
2.2	Lcn2/NGAL .....	114

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>139</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>145</b>



# INTRODUCCIÓN

---



## **1 Aterotrombosis**

La enfermedad cardiovascular (ECV) una de las primeras causas de mortalidad(1). En relación a su prevalencia, durante 2013 los eventos cardiovasculares derivados de la aterosclerosis representaron el 84,5% de las muertes por ECV y el 28,2% de las muertes totales(2). La mortalidad asociada a la enfermedad arterial periférica (PAD) se ha incrementado durante los últimos años, siendo este incremento mucho mayor en mujeres y ampliándose la epidemiología a poblaciones de menor edad(3).

Actualmente, el tratamiento farmacológico que reciben mayoritariamente los pacientes consiste en inhibidores de la hidroximetil-glutaril coenzima A reductasa (farmacológicamente conocidos como estatinas), una enzima implicada en la síntesis de colesterol. Pero incluso los pacientes tratados con estatinas siguen manteniendo un alto riesgo cardiovascular(4, 5). Por otra parte, los resultados de varios ensayos clínicos que probaron la administración de sustancias antioxidantes no demostraron una reducción en el número de eventos cardiovasculares(6, 7). También se encuentran bajo evaluación en ensayos clínicos fármacos antiinflamatorios cuya eficacia en aterotrombosis aún no ha sido demostrada(8).

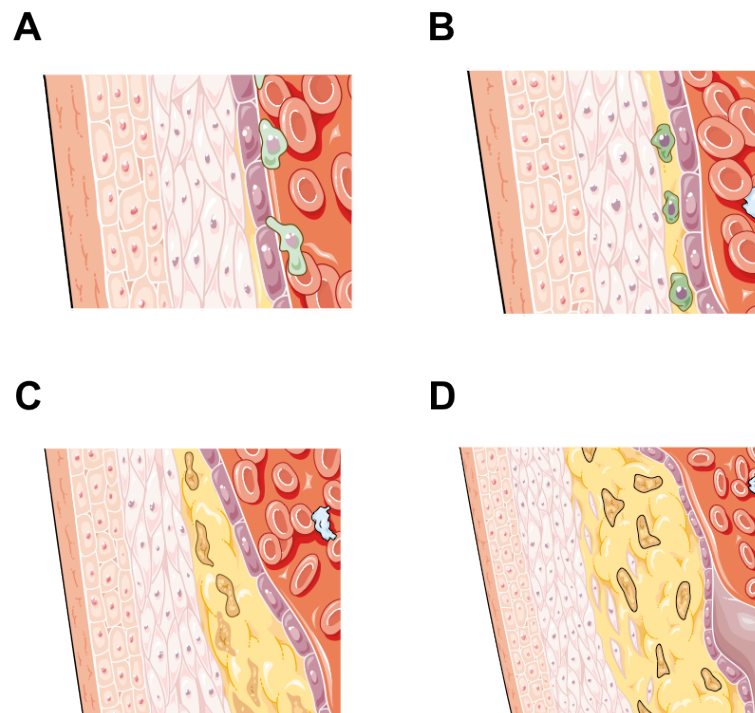
Respecto a los factores de riesgo, la edad se encuentra directamente asociada a su desarrollo. El sexo masculino también representa un mayor riesgo asociado de padecer aterosclerosis debido a factores hormonales, y/o de hábitos de vida. La dislipemia es uno de los factores claves en la aterogénesis. Se ha descrito una fuerte asociación entre los niveles plasmáticos de lípidos y el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. En concreto, los niveles plasmáticos de LDL satisfacen los postulados modificados de Koch como agente causal de aterosclerosis(9). Por otra parte, los bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) reducen el eflujo de colesterol de los macrófagos de la placa, produciendo un efecto adicional. La diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico pueden cerrar un círculo de factores interconectados que favorecen el desarrollo de aterosclerosis. El tabaco produce disfunción vascular mediada por una reducción en la biodisponibilidad de

óxido nítrico, la expresión de moléculas de adhesión y la consecuente disfunción endotelial. Fumar también produce un incremento en la adherencia de plaquetas y monocitos, favoreciendo un ambiente procoagulante y proinflamatorio(10). Por otra parte, la hipertensión arterial (HTA) constituye un importante factor de riesgo, ya que aumenta la presión que soporta la pared vascular, de forma que los procesos de reparación tisular no pueden desarrollarse correctamente(11). Aunque la mortalidad se ha reducido en los últimos años gracias a las nuevas estrategias de prevención y al desarrollo de tratamientos farmacológicos, la ECV continúa siendo responsable de muchas muertes, y en la mayoría de los casos, la aterotrombosis es la causa subyacente de la ECV(12).

### ***1.1 Aterosclerosis***

La aterosclerosis es una enfermedad crónica y sistémica. El proceso de aterogénesis se inicia con estímulos como la dislipemia, dando lugar a un cambio de permeabilidad en el endotelio que permite la entrada y retención de lipoproteínas de baja densidad (LDL; **Figura 1A**) en la pared arterial(13), donde pueden oxidarse a causa de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas tanto por macrófagos como por células de músculo liso vascular (CMLV), iniciando la respuesta inflamatoria y favoreciendo el reclutamiento de células del sistema inmunológico. Las células endoteliales, que normalmente están en contacto con los leucocitos circulantes sin que se produzca interacción, expresan en su superficie moléculas de adhesión para los leucocitos (**Figura 1A**). Las LDL son fagocitadas por los macrófagos infiltrados o por las CMLV (**Figura 1B**), conduciendo a la acumulación intracelular de colesterol y a la formación de células espumosas (**Figura 1C**). La formación de la placa de ateroma también requiere la migración de CMLV de la capa media a la íntima y su proliferación (**Figura 1C**) en respuesta a ciertos estímulos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En la capa íntima se produce la secreción de colágeno y elastina, formando la capa fibrosa, que recubre la placa, mayoritariamente compuesta por células espumosas y por restos apoptóticos de estas mismas células. La ineficacia en el proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (también denominado eferocitosis) puede

conducir a la acumulación de desechos celulares con un alto contenido en lípidos, lo que se conoce como *core* lipídico (**Figura 1D**) o *core* necrótico(14). Los macrófagos y las células intrínsecas de la pared (endoteliales y CMLV) también producen el factor tisular, que tiene actividad procoagulante, confiriendo al *core* lipídico mayor capacidad trombogénica. En las lesiones avanzadas también se pueden encontrar cristales de colesterol y neovasos. La complicación más seria de la aterosclerosis es la trombosis, que generalmente se produce tras la rotura de la placa(11).



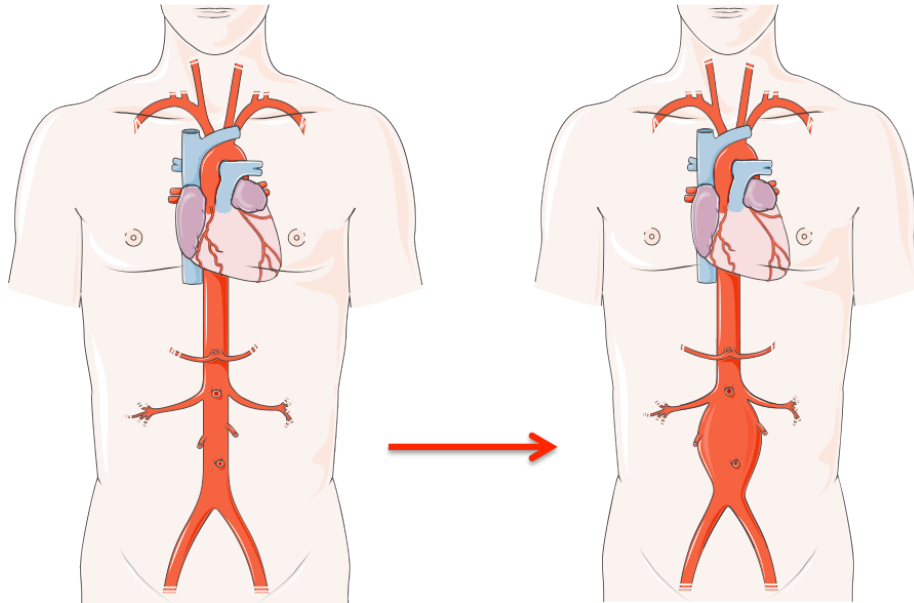
**Figura 1. Progresión de la aterosclerosis.** A. El incremento de la permeabilidad vascular permite la entrada y retención de LDL. B. Los monocitos infiltrados se diferencian a macrófagos y fagocitan las LDL. C. Se incrementa la acumulación de lípidos, se forman células espumosas y se produce la migración y proliferación de CMLV. D. Crecimiento de la placa de ateroma y formación de un *core* lipídico por apoptosis de las células espumosas.

Los modelos animales utilizados para estudiar la aterosclerosis incluyen conejos, cerdos, primates y roedores, cada uno de ellos con diferentes ventajas e inconvenientes(15). La especie más utilizada actualmente es el ratón, ya que es pequeño, tiene un ciclo vital relativamente corto, su mantenimiento no conlleva un coste económico alto, y pueden ser modificados genéticamente mediante distintos procedimientos. Por otra parte, existen ciertas limitaciones en referencia a la similitud entre la aterosclerosis humana y la aterosclerosis experimental. Las

lesiones murinas rara vez desarrollan la inestabilidad que se produce en los eventos cardiovasculares humanos. Además, las lesiones se desarrollan en lugares distintos. En humanos, las arterias coronarias son uno de los principales lugares donde se desarrolla aterosclerosis, mientras que en los ratones se produce principalmente en el arco aórtico. Por otra parte, el metabolismo de lipoproteínas también difiere entre ambas especies(16). Los primeros estudios sobre lesiones vasculares en roedores comenzaron hace más de 60 años con dietas hipercolesterolémicas administradas a ratas(17). Sin embargo, su estandarización como modelo experimental de aterosclerosis ocurrió tras la aparición del ratón deficiente para la apolipoproteína E (ApoE<sup>-/-</sup>)(18), que desarrolla aterosclerosis espontánea sin necesidad de dietas especiales, aunque estas pueden ser utilizadas para acelerar la progresión de la enfermedad. También son muy empleados los ratones deficientes para el receptor de LDL (Ldlr<sup>-/-</sup>), que resultan un buen modelo de hipercolesterolemia familiar(19).

## ***1.2 Aneurisma de aorta abdominal***

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una patología que consiste en una dilatación localizada y permanente de la aorta, generalmente en su porción infrarrenal. Se define un aneurisma como una dilatación mayor al 50% del diámetro del vaso en zonas adyacentes por lo que, en la aorta abdominal, se considera patológico un diámetro mayor o igual a 3 cm (**Figura 2**). Se puede considerar una enfermedad sistémica, y en este sentido se ha demostrado una importante asociación entre pacientes con AAA y con enfermedad coronaria o PAD. Muchas veces ocurre de forma silente, por lo que el diagnóstico se produce de forma casual mediante alguna prueba de imagen (ultrasonografía, tomografía axial computarizada o resonancia magnética nuclear). Además, la enfermedad se desarrolla con una progresiva dilatación de la aorta, que no ocurre de forma lineal, sino que presenta unos puntos de aceleración y otros de estabilidad, dificultando el seguimiento y el pronóstico. Cuando ocurre la rotura del aneurisma, la mortalidad asciende hasta el 75%(20, 21).



**Figura 2. Desarrollo del aneurisma aórtico abdominal.**

Respecto a su epidemiología, afecta 6 veces más a los hombres que a las mujeres, con una incidencia del 5-8% en varones de 65 años, y un 2% de la población femenina en el mismo rango de edad(20). Por otra parte, la incidencia de rotura aneurismática representa el 1-2% del total de muertes(22).

Actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico que sea capaz de limitar la progresión del aneurisma o evitar su rotura. Cuando el AAA tiene un diámetro inferior a 5 cm, se realiza un seguimiento periódico del paciente con pruebas de imagen, un control de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos y un tratamiento farmacológico con antiagregantes y estatinas. Cuando el diámetro del aneurisma supera los 5 cm, dado que el riesgo de rotura es alto, se interviene quirúrgicamente. En función de las características del paciente y de la morfología y la localización del AAA, la intervención quirúrgica puede consistir en la colocación de una endoprótesis por cateterismo o en cirugía abierta(23).

Comparte varios factores de riesgo asociados con la aterosclerosis como son: edad, sexo, susceptibilidad genética, , bajos niveles circulantes de HDL, el consumo de tabaco o la enfermedad coronaria(24). Las muertes por rotura del aneurisma ocurren normalmente en mayores de 65 años, y a partir de ese momento el riesgo

se incrementa un 40% cada 5 años(25). El riesgo en varones es muy superior al de las mujeres, debido a factores hormonales, genéticos y la diferente exposición a factores de riesgo(26). Sin embargo, la enfermedad se desarrolla de una forma más severa en mujeres, en las que presenta un crecimiento más rápido, mayor riesgo de rotura con menores diámetros y mayor mortalidad hospitalaria asociada a la rotura y la intervención(27). La historia familiar positiva en primer grado de AAA aumenta el riesgo de que una persona lo padezca hasta diez veces, y además se presenta a edades más tempranas(28). El tabaco incrementa el riesgo relativo del AAA 7,6 veces(29). El número de cigarrillos al día es importante, pero lo es más la duración del hábito. Una vez cesado el consumo de tabaco, el riesgo de AAA se mantiene hasta 10 años. Las causas a través de las cuales el tabaco está implicado en la formación del AAA son aún desconocidas. Se valoran mecanismos como la inhibición en la síntesis de colágeno, una alteración en la expresión de metaloproteinasas (MMP) y su relación con el estrés oxidativo(30). La HTA se asocia a un incremento del riesgo de formación del AAA y su rotura debido a la presión adicional que soporta la pared vascular. Sin embargo, el tratamiento antihipertensivo no ha demostrado eficacia para frenar su progresión(31). A nivel de lípidos, se han descrito los bajos niveles circulantes de HDL como factor de riesgo para el AAA(32). Por otra parte, otras líneas de investigación apuntan a que las alteraciones lipídicas en el AAA podrían estar relacionadas con la presencia de LDL anormales, pequeñas y con un fenotipo que podría denominarse aterogénico(33). La incidencia de enfermedad coronaria y de PAD, ambas reflejo de la presencia de enfermedad aterosclerótica, es muy alta en pacientes con AAA. En contraste con su papel como factor de riesgo en aterosclerosis, la diabetes se ha descrito como factor protector en el desarrollo del AAA, y está asociada a una baja prevalencia del AAA y, en caso de existir, a un crecimiento más lento(31).

El AAA constituye por tanto una forma de aterotrombosis particular, en cuya patogenia desempeña un papel fundamental la proteólisis(34). Sin embargo, mientras que en la aterosclerosis el evento característico es la formación de un *core* lipídico en la neointima arterial, el AAA está caracterizado por la formación de un trombo intraluminal, la dilatación y desestructuración de la capa media, y la



presencia de una reacción inmunoinflamatoria, fibrosis y neoangiogénesis en la capa adventicia.

Como consecuencia de la dilatación arterial se produce una alteración en el flujo hemodinámico, y como respuesta para restablecer el flujo laminar se genera un trombo intraluminal (ILT). El ILT presenta distintas capas (luminal y abluminal), de las cuales la capa luminal es la más rica en elementos celulares(35), entre los que destacan los neutrófilos, los eritrocitos y las plaquetas. Existe una relación entre plaquetas y neutrófilos, de manera que la inhibición de la agregación o de la activación plaquetaria parece limitar el crecimiento aneurismático(36) y estar asociada con una menor acumulación de neutrófilos dentro del ILT(37). El ILT es un neot tejido biológicamente activo, y debido a su presencia no hay endotelio o íntima(38). La capa media se encuentra reducida y dañada, ya que los componentes elásticos y las CMLV prácticamente han desaparecido. Finalmente, la capa adventicia presenta características inmunoinflamatorias, fibróticas y neoangiogénicas.

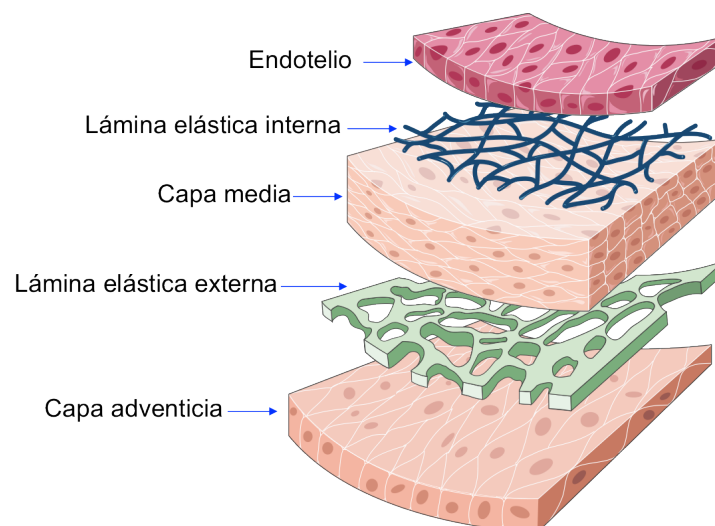
Actualmente, los modelos murinos de inducción de AAA son los más empleados por diversas razones como el bajo coste económico o la facilidad de manipulación genética, así como los que más información han proporcionado sobre su fisiopatología(39). Existen modelos basados en la modificación genética de MMP-3(40) o en el inhibidor tisular de MMP-1 (TIMP-1)(41), los cuales desarrollan degeneración espontánea de la capa media. Sin embargo, los más empleados son aquellos que inducen la formación de AAA mediante infusión de agentes hipertensivos como angiotensina II (AngII)(42) o mediante tratamiento con elastasa *in situ*(43).

La perfusión de elastasa en la aorta de ratón causa una dilatación que inicialmente es leve-moderada. Sin embargo, a partir de los 14 días la dilatación puede llegar a superar el 100% del diámetro aórtico. Este modelo se caracteriza por una intensa degradación de la capa media, por lo que el componente inmunoinflamatorio de la pared aórtica está formado principalmente por monocitos, con presencia de neutrófilos en la adventicia(43). El daño inducido por la elastasa aumenta la

expresión de MMP y otras proteasas en la zona de infiltrado de macrófagos(44). La principal desventaja de este modelo consiste en el estrés mecánico producido durante la intervención, que deriva en una elevada tasa de mortalidad. Las principales ventajas son la reproducibilidad de distintas situaciones patológicas del AAA, como el reclutamiento de leucocitos en fases iniciales, la presencia de respuesta inflamatoria en la pared arterial, la degradación de elastina y colágeno en la capa media y la consecuente dilatación aórtica.

## **2 Mecanismos implicados en el remodelado vascular patológico**

La sangre circula por el lumen de la arteria en contacto directo con el endotelio, que es una monocapa celular y la más interna de la pared arterial. El endotelio se apoya en la capa subendotelial, que consiste en tejido conectivo y puede presentar a veces CMLV dispersas. Más externamente se encuentra la capa media, de mayor grosor, formada también por CMLV y rodeada por fibras de colágeno y elastina que determinan sus propiedades físicas. La capa adventicia es la más exterior y está constituida por tejido conectivo.



**Figura 3. Estructura de la pared arterial.**

En las enfermedades que cursan con un remodelado de la pared vascular, como ocurre en la aterosclerosis o en el AAA, se pueden encontrar mecanismos fisiopatológicos comunes que alteran la estructura y la función de los distintos componentes de la pared vascular. Entre ellos destacan principalmente el estrés oxidativo, la inflamación, la proteólisis y consecuente degradación de la matriz extracelular, la muerte celular y la neoangiogénesis.

## ***2.1 Estrés oxidativo***

El estrés oxidativo puede definirse como un desequilibrio entre el balance de sustancias oxidantes y antioxidantes, promovido por un aumento de moléculas con carácter oxidante en detrimento de las defensas antioxidantes, lo que produce una alteración de la homeostasis redox(45). El estrés oxidativo está mediado bien por ROS, bien por especies reactivas de nitrógeno (RNS), y es el responsable de la modificación de las macromoléculas. Los radicales libres son moléculas o átomos que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, confiriéndolas gran reactividad redox. Por otro lado, se encuentran las especies reactivas que no contienen electrones desapareados, pero son especies oxidantes. Entre ellos se encuentran el peróxido de hidrógeno, el ozono, el oxígeno singlete, o el dióxido de nitrógeno(46). Además de oxidantes de origen exógeno, el organismo también genera ROS de forma fisiológica, que desempeñan un papel muy importante a nivel celular, ya que pueden modular rutas de señalización específicas, lo que se conoce como señalización redox(47).

Entre los radicales libres endógenos más reactivos se encuentran el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ), que resulta de la reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), otro radical libre que es poco reactivo por si solo pero es intermediario de otros como el peroxinitrito(48, 49). El NO es producido en condiciones fisiológicas por la óxido nítrico sintasa constitutiva de las células endoteliales (eNOS) y en condiciones de estrés por su isoforma inducible en células fagocíticas (iNOS), mientras que el  $\text{O}_2\cdot^-$  se genera mediante la reducción del oxígeno molecular a través de varias enzimas como la xantina

oxidasa, la nicotín adenín dinucleótido (fosfato) [NAD(P)H] oxidasa, la citocromo P450 monoxigenasa mitocondrial o la lipoxigenasa en distintos tipos celulares como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y CMLV(48).

El estrés oxidativo puede producir daños directos sobre macromoléculas, tales como lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y glúcidos(50), desempeñando un papel importante en la aterotrombosis(51). La oxidación de lipoproteínas como LDL, mediante la formación de radicales en ApoB, las transforman en compuestos proinflamatorios y citotóxicos implicados en la progresión de la enfermedad vascular que además son capaces de activar la NAD(P)H oxidasa(52). ROS y RNS también están implicados en la patogenia del AAA(53). En el microambiente del AAA se produce una situación de estrés oxidativo debida tanto al descenso de la actividad de enzimas antioxidantes(54, 55) como a la mayor actividad de enzimas productoras de especies reactivas(55, 56). Algunas enzimas implicadas en la patogenia de la aterosclerosis como la lipoxigenasa, la ciclooxigenasa o el citocromo P450 también podrían estar contribuyendo a generar ROS en la pared vascular, aunque su papel en la formación y progresión del AAA no está demostrado(57).

Las leucocitos infiltrados sintetizan también citoquinas que inducen la actividad NAD(P)H oxidasa de las células vasculares y de las propias células inmunoinflamatorias. Los factores de crecimiento como AngII o PDGF, y mediadores lipídicos como los leucotrienos o el ácido lisofosfatídico, también son capaces de inducir la producción de ROS mediante la actividad NAD(P)H oxidasa(58, 59). Por otra parte, la lisis de eritrocitos (o hemólisis) desencadena un aumento de hemoglobina libre extracelular que produce un aumento de estrés oxidativo por la formación de anión superóxido y  $H_2O_2$ (60). Tanto el grupo hemo como el hierro libre pueden incrementar la capacidad oxidante del entorno vascular.  $H_2O_2$  y  $Fe^{2+}$  pueden reaccionar mediante la reacción de Fenton produciendo radical hidroxilo:  $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$ . La reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo a partir de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ :  $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$ . Además, el hierro liberado actúa como agente quimiotáctico para los macrófagos. Tanto los macrófagos como los leucocitos infiltrados pueden generar grandes cantidades de anión superóxido y otras especies oxidantes como  $H_2O_2$ .

Finalmente, las alteraciones que se producen en las fuerzas hemodinámicas tanto en AAA por el trombo intraluminal, como en aterosclerosis por la presencia de la placa de ateroma, pueden favorecer la producción de ROS vía NAD(P)H oxidasa en CMLV y exacerbar tanto el estrés oxidativo como la inflamación(61).

## ***2.2 Inflamación***

La inflamación es un proceso biológico en el cual participan de forma coordinada el sistema inmune innato y el adquirido. Ocurre frente a una agresión que puede estar producida por diversos factores de tipo biológico, químico o físico. La finalidad de la inflamación es la eliminación del agente causante o su aislamiento y la reparación del daño producido en el tejido(62).

La respuesta inmune innata ofrece una respuesta inmediata pero inespecífica. Este sistema representa la primera barrera defensiva del organismo e incluye varios tipos celulares como células dendríticas, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células NK, y moléculas del sistema del complemento, citoquinas y quimioquinas. La respuesta inmune adquirida, ejerce su protección sobre el organismo mediante respuestas antigénicas específicas y mediante la generación de memoria inmunológica, y está mediada por células presentadoras de antígenos, linfocitos y anticuerpos(62).

Si las condiciones nocivas cesan, la respuesta inflamatoria aguda cesa y el sistema inmune recupera sus condiciones homeostáticas basales(63). Sin embargo, si las condiciones dañinas se mantienen, entonces la respuesta inflamatoria también se mantiene sostenida en el tiempo dando lugar a un estado de inflamación crónica, que se ha descrito en diversas patologías como la aterotrombosis. Los estados de inflamación crónica parecen estar relacionados con el mal funcionamiento del tejido, es decir, con el desequilibrio homeostático de una o más funciones fisiológicas(62).

La inflamación en la pared arterial puede iniciarse mediante estímulos bioquímicos lesivos(64) y mediante los depósitos y modificaciones de lipoproteínas(65). El endotelio activado permite entonces la extravasación selectiva de distintas células del sistema inmune a través de la expresión de selectinas que interaccionan con las integrinas y los receptores de quimioquinas presentes en los distintos leucocitos(66).

Los macrófagos son una población heterogénea y de origen mayoritariamente monocitario. Tras la infiltración en el tejido, los monocitos se diferencian a macrófagos y se transforman en células residentes. Este proceso de diferenciación conlleva un aumento de tamaño celular y un mayor desarrollo del sistema lisosomal, así como un incremento de su metabolismo energético derivado de un aumento en el número y tamaño de las mitocondrias. Los macrófagos se han dividido clásicamente en dos subpoblaciones: macrófagos M1 o M2. Los macrófagos M1 se caracterizan por mantener y potenciar la respuesta inflamatoria, promoviendo el daño tisular mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral ( $TNF\alpha$ ) y la producción de grandes cantidades de ROS y RNS(67). Por otra parte, los macrófagos M2 secretan citoquinas antiinflamatorias como interleuquina 10 (IL-10) o el factor de crecimiento transformante ( $TGF-\beta$ ), y promueven la resolución de la inflamación, dando lugar a la reparación del tejido(68). Los macrófagos son células con una alta plasticidad funcional y pueden cambiar de fenotipo en respuesta al microambiente(69). Los dos tipos de macrófagos se hayan en las lesiones aterotrombóticas, aunque el concepto M1/M2 es más complejo, al menos en estas enfermedades, y existen otros fenotipos alternativos que ejercen diferentes funciones(70, 71).

Los macrófagos están presentes de forma abundante tanto en la placa de ateroma como en la capa adventicia del AAA. Sin embargo, los neutrófilos son los primeros en acudir a la zona dañada. Sus funciones principales consisten en la fagocitosis y en la liberación del contenido de sus gránulos, que contienen diversas proteasas, y que producen un aumento de ROS y RNS(63). Se ha observado que el nivel de neutrofilia inducido por hipercolesterolemia se correlaciona positivamente con las lesiones ateroscleróticas en modelos experimentales(72). Además, los valores de

leucocitos circulantes analizados en estudios epidemiológicos son un factor de riesgo independiente para la ECV(73), por lo que se ha postulado que los neutrófilos – que representan la primera barrera de la inmunidad – desempeñan un papel fundamental en la progresión de la enfermedad aterotrombótica. Además, también se produce el reclutamiento y la activación de linfocitos tanto en la placa de ateroma como en el AAA. En aterosclerosis, la activación de estas células y su polarización a Th1 regula el inicio y el crecimiento de la placa de ateroma y ha sido implicada en su desestabilización y rotura(74).

Las quimioquinas, los mediadores lipídicos o lípidos bioactivos, así como las moléculas coestimuladoras, que promueven una respuesta adaptativa, regulan la respuesta inflamatoria y guían la inmunidad celular mediante las interacciones con las distintas poblaciones celulares(12) presentes tanto en la placa de ateroma como en el AAA.

Las citoquinas inflamatorias como  $TNF\alpha$ , IL-1 o IL-6 son producidas por muchos tipos celulares. Participan en distintas funciones como la activación del endotelio y los leucocitos o la inducción de la fase aguda de la respuesta inflamatoria. Las quimioquinas también son producidas por muchos tipos celulares en respuesta a distintos estímulos, y controlan la extravasación leucocitaria y la quimiotaxis hacia los tejidos afectados. Por ejemplo, cuando la situación de estrés o de disfunción del tejido es extrema, la acción ejercida por los macrófagos resulta insuficiente, produciéndose la secreción de la quimioquina CCL-2, que produce el reclutamiento de más macrófagos(75). Además de mediar el reclutamiento de células del sistema inmunológico, las quimioquinas controlan la homeostasis y la activación de estas células. En las primeras etapas de aterogénesis, el endotelio libera la quimioquina CXCL-1 en respuesta al ácido lisofosfatídico presente en las LDL y se produce el reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la pared arterial a través del receptor CXCR-2. Junto a CCL-2, el eje CXCL-1/CXCR-2 forma un mecanismo de retroalimentación positiva para el reclutamiento de monocitos. Por otra parte, CXCL-1 también media el aumento de los niveles circulantes de neutrófilos y monocitos activados (caraterizados por la expresión de Ly6C en sus membranas) inducida por hipercolesterolemia, facilitando su reclutamiento en la pared

arterial(76). Las quimioquinas también son importantes mediadores entre la inmunidad innata y la adaptativa. Por ejemplo, la quimioquina CCL-17 es secretada por células dendríticas y aumenta el reclutamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la pared aórtica, regulando la homeostasis de los linfocitos Treg y promoviendo la aterotrombosis(12, 77).

Los mediadores lipídicos se biosintetizan principalmente a partir del ácido araquidónico y del ácido lisofosfatídico y son producidos a partir de la fosfatidilcolina presente en la membrana plasmática por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2). El ácido araquidónico puede ser metabolizado por las cicloxigenasas COX1 y COX2 para formar eicosanoides (prostaglandinas y tromboxanos), o por las lipoxigenasas, dando lugar a leucotrienos y lipoxinas. Los eicosanoides regulan diversos procesos como la permeabilidad vascular, la vasodilatación o la agregación plaquetaria. Los leucotrienos transducen señales mediadas por receptor que producen varios efectos proinflamatorios de relevancia en aterosclerosis, como el reclutamiento y activación leucocitaria, la proliferación de CMLV y la disfunción endotelial(78). Las lipoxinas son otros mediadores lipídicos, que junto a las resolvinas, las protectinas y las maresinas (todos ellos derivados de los ácidos grasos  $\Omega$ -3 de la dieta), inhiben la inflamación y promueven la reparación tisular(79, 80). Las lipoxinas median sus efectos a través del receptor *N-formyl peptide receptor 2* (FPR2/ALX), que es expresado por macrófagos y CMLV, y cuya activación favorece los depósitos de colágeno en la placa de ateroma, aumentando su estabilidad(81). Por otra parte, el ácido lisofosfatídico se acetila para dar lugar a los factores activadores de plaquetas, que median distintos procesos inflamatorios como el reclutamiento de leucocitos, la vasodilatación y la vasoconstricción, el aumento de la permeabilidad vascular y la activación plaquetaria(62).

La inflamación tiene una importante relación con la aterotrombosis como se puede observar, por ejemplo, en el aumento de los niveles de Proteína C Reactiva (CRP) o en el incremento local de células inflamatorias, encontrando en la aorta patológica abundantes linfocitos y macrófagos que son reclutados mediante la actividad de quimioquinas y leucotrienos(12, 82). Una vez reclutadas, su activación por los



mediadores lipídicos, así como por diferentes moléculas coestimuladoras, determina su papel en la respuesta inmunoinflamatoria, promoviéndola o atenuándola. La respuesta inmunoinflamatoria también altera el comportamiento de células endoteliales y CMLV. Por lo tanto, la inflamación no sólo se asocia con la presencia de la placa de ateroma o del AAA, sino que juega un papel en su patogenia(12, 83). En general, se puede ver la inflamación como un protagonista de la fisiopatología de la aterotrombosis al que se pueden atribuir muchos de los factores de riesgo conocidos(84).

### ***2.3 Proteólisis***

La matriz extracelular (ECM) proporciona la plataforma estructural y funcional de los vasos sanguíneos, por lo que las alteraciones en su síntesis y/o degradación son clave en el desarrollo del remodelado vascular patológico (85). La evolución de la placa de ateroma hasta estadios de lesiones avanzadas es un proceso lento, que se asocia tanto con el incremento de su contenido celular y de ECM como con el aumento de la actividad proteolítica, principalmente en macrófagos y CMLV(86). En el AAA, la degradación de la ECM hace que la capa media disminuya su grosor, produciéndose la dilatación y la potencial rotura de la pared arterial(87).

Las MMP son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc, producidas por diversos tipos celulares (endotelio, músculo liso, monocitos y linfocitos), que degradan numerosos componentes de la ECM y otras proteínas no relacionadas. Se sintetizan y secretan como proenzimas inactivas y poseen un dominio propeptídico rico en cisteínas, capaz de plegarse e interactuar con el  $Zn^{2+}$  del dominio catalítico, impidiendo así su actividad enzimática. La activación de las MMP requiere la escisión del dominio propeptídico(88). Las MMP favorecen la perpetuación de la reacción inflamatoria mediante el incremento de la infiltración monocitaria en la pared vascular. El aumento en la expresión de determinadas MMP conlleva una mayor infiltración de macrófagos, con rotura de la lámina elástica interna y aceleración del remodelado vascular patológico(89, 90). Además, las MMP también contribuyen a la inestabilidad de la placa(91), donde su expresión y actividad se encuentra principalmente asociada a macrófagos(92) y

puede ser una consecuencia del aumento de la producción de anión superóxido, ya que coincide con la expresión de la NADPH oxidasa y la producción de radicales libres(93). De forma similar, la actividad NADPH oxidasa – así como iNOS - también se encuentra aumentada en la pared patológica del AAA(94), de forma paralela a una mayor expresión de MMP que está asociada a un mayor crecimiento del AAA(95, 96).

Las MMP también se encuentran reguladas por diversos estímulos inflamatorios como  $TNF\alpha$ (97). En estudios experimentales se ha demostrado que CRP, un biomarcador inflamatorio y de riesgo aterotrombótico, también induce la expresión de MMP en células endoteliales(98). Los linfocitos también son importantes fuentes de MMP y otras proteasas que degradan proteínas estructurales como colágeno, elastina y laminina, conduciendo a la degradación de la pared arterial(99).

En el AAA, las proteasas presentes en el trombo, así como las liberadas a causa de la respuesta inmunoinflamatoria adventicial, llevan a cabo la degradación de la ECM(38). Esta degradación de proteínas estructurales, unida a la reducida capacidad para sintetizar nuevas proteínas de matriz, conducen al debilitamiento y a la dilatación de la pared aórtica, así como a una posible rotura(100). Algunos componentes presentes en el ILT, como la plasmina, también colaboran en la degradación de proteínas de la ECM como la fibronectina(101). La presencia de neutrófilos – células habituales en el ILT – se asocia a un aumento en los niveles de MMP-8, MMP-9 y elastasa. Además, su presencia limita la capacidad de las células mesenquimales de colonizar el trombo, inhibiendo así el proceso endógeno de reparación(102).

En general, se puede decir que el desequilibrio de la actividad proteolítica en aterotrombosis es crítico para su desarrollo. En la placa de ateroma propicia su desarrollo e inestabilidad, mientras que en el AAA contribuye a la propia dilatación y a la potencial rotura.

## **2.4 Muerte celular**

La muerte celular es un proceso crítico para mantener la homeostasis tisular y eliminar potenciales células perjudiciales. Además, las células expuestas a agentes deletéreos, extracelulares y/o intracelulares que pueden generar un ambiente nocivo irreversible para los tejidos, pueden seguir distintas vías de muerte celular dependiendo del estímulo y del tipo de célula(103).

La necrosis es un tipo de muerte celular que se caracteriza por el incremento del tamaño celular debido a la vacuolización del citoplasma, desorganización de los orgánulos celulares, contracción de la membrana mitocondrial, dispersión de la cromatina y rotura de la membrana celular, lo que produce la liberación del contenido intracelular al espacio extracelular, desencadenando una respuesta inflamatoria(104).

Apoptosis es un término que indica otra forma de muerte celular distinta a la necrosis, en la cual no hay pérdida de la integridad de la membrana celular y por lo tanto no se desencadena respuesta inflamatoria. La apoptosis – o muerte celular programada – es un proceso activo en el cual se produce gasto energético y que se distingue por la formación de cuerpos apoptóticos, mediante los cuales se evita la liberación del contenido intracelular al espacio extracelular. Fisiológicamente, es un proceso a través del cual se eliminan células dañadas o anómalas con el fin de mantener la homeostasis tisular(103, 105).

En la placa de ateroma, las células espumosas mueren en las lesiones avanzadas, colaborando así en la formación del *core* lipídico(11). Algunas de estas células mueren por apoptosis, pero la gran mayoría lo hace mediante necrosis(104). En el AAA, el adelgazamiento de la capa media ocurre por la apoptosis de las CMLV y por la destrucción de la ECM(106).

## ***2.5 Neoangiogénesis***

La angiogénesis es un proceso fundamental para el desarrollo de nuevos vasos y juega un importante papel en procesos fisiológicos como el crecimiento, el desarrollo y la reparación tisular. En condiciones fisiológicas, el proceso angiogénico se encuentra inhibido en adultos y las células endoteliales se encuentran en estado quiescente. Sin embargo, los factores proangiogénicos presentes en condiciones patológicas como la aterotrombosis conllevan un desequilibrio de la angiogénesis o neoangiogénesis(107).

La neoangiogénesis ocurre más frecuentemente en los lugares de la pared arterial que contienen un mayor infiltrado inflamatorio, especialmente macrófagos y linfocitos, en un proceso dirigido por factores proangiogénicos como el PDGF(108). También ciertas quimioquinas como CCL-2 o las propias MMP, liberadas principalmente por macrófagos y linfocitos, pueden actuar como factores proangiogénicos además de potenciar la respuesta(109). La hipoxia y la inflamación son los principales factores desencadenantes de neoangiogénesis(107), aunque las células endoteliales y CMLV también pueden liberar factores proangiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), en respuesta a los lípidos que se retienen en la pared arterial patológica(108). El grosor íntima-media (IMT) y el infiltrado de células inflamatorias también están mediados por la presencia de neovasos(108). Estos neovasos son inmaduros y tienen una mayor permeabilidad, por lo que son considerados la principal causa de las hemorragias(110, 111). Además, los eritrocitos liberados aumentan el reclutamiento de macrófagos en la pared arterial(111, 112).

Por otra parte, la actividad de las MMP resulta indispensable para la neovascularización de la placa de ateroma, un proceso asociado con la vulnerabilidad de las placas avanzadas, y que parece necesario para su crecimiento(113). En el AAA, la neovascularización no invade el ILT, permaneciendo en la adventicia y la parte externa de la capa media. Además, se ha descrito un incremento en la expresión de factores proangiogénicos asociado al lugar de rotura del AAA(114).

### **3 Biomarcadores**

Un biomarcador es una sustancia biológica que representa un proceso fisiológico o patológico en el organismo del que procede en un momento dado, lo cual puede resultar de utilidad en su aplicación para detectar la presencia o pronosticar la evolución de una determinada enfermedad. La investigación y el descubrimiento de nuevos marcadores puede ayudar a conocer y comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad. Un biomarcador ideal debe cumplir una serie de características como presentar una relación causal con la enfermedad que señala, ser específico para esa enfermedad en particular, estar implicado en sus mecanismos fisiopatológicos, y ser capaz de reflejar la severidad y la progresión de la enfermedad(115). El descubrimiento de nuevos biomarcadores puede apoyarse en los conocimientos fisiopatológicos de la enfermedad o en las nuevas tecnologías disponibles como la proteómica. A nivel cardiovascular, la mayoría de biomarcadores pueden asociarse a diferentes procesos fisiopatológicos, como por ejemplo las moléculas de adhesión (implicadas en la disfunción endotelial), distintas quimioquinas implicadas en la respuesta inmunoinflamatoria o MMP de relevancia en el proceso proteolítico(116). Otros marcadores como el IMT se pueden valorar mediante pruebas como la ultrasonografía, y se asocian directamente a la presencia de la ECV. Por ello, se pueden emplear para monitorizar la progresión de la enfermedad y/o la eficacia de los tratamientos aplicados al paciente(117).

Los biomarcadores relacionados con la inflamación están elevados en pacientes con enfermedad aterotrombótica. Entre ellos se encuentran múltiples citoquinas y la CRP, que es el más ampliamente estudiado(118) junto al coestimulador CD40L(116). Respecto al estrés oxidativo, se han publicado numerosos estudios sobre la sobre la PLA2 asociada a lipoproteínas (LP-PLA2), donde se han descrito correlaciones entre la concentración de PLA2 circulante y el aumento en el riesgo de eventos cardiovasculares, incluso después del ajuste multivariable para los factores de riesgo tradicionales. Además la LP-PLA2 es un factor de riesgo independiente y complementario de la CRP(119-121). Por otra parte, los

biomarcadores circulantes relacionados con el estrés oxidativo en el AAA aún deben ser identificados y valorados(122). Algunos biomarcadores estudiados están relacionados de forma directa con la proteólisis de la ECM. Se ha demostrado que los péptidos de elastina y el propéptido aminoterminal del procolágeno tipo III están elevados en suero de pacientes con AAA. Sin embargo, presentan una baja sensibilidad y especificidad(123). Además, varios factores de riesgo en aterotrombosis, como la HTA, se han asociado a un aumento en las concentraciones de diversas MMP circulantes(124). Por otra parte, se ha descrito un aumento significativo en las concentraciones de MMP-9 y TIMP-1 en pacientes con aterosclerosis carotídea(125, 126).

Encontrar biomarcadores útiles es complicado, ya que la enfermedad aterotrombótica es multifactorial y tiene una fisiopatología compleja que no se conoce en su totalidad. A pesar de ello, la identificación de biomarcadores podría ayudar en las decisiones clínicas, proporcionar una mejor comprensión de la enfermedad y abrir nuevas posibilidades terapéuticas(115). En este sentido, se ha propuesto que la información proporcionada por un conjunto de biomarcadores podría favorecer su aplicación clínica. Así, la presencia en el AAA de varios biomarcadores alterados, es capaz de determinar el grupo de pacientes de alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad(118). Actualmente no se conoce ningún marcador bioquímico de aterotrombosis con la especificidad y sensibilidad suficientes como para poder ser utilizado en la práctica clínica. Sin embargo, la existencia de marcadores biológicos ayudaría a diagnosticar la enfermedad y a conocer su expansión y evolución, así como a valorar la respuesta de los pacientes al tratamiento.

## 4 Microvesículas

Las microvesículas son un conjunto heterogéneo de vesículas secretadas por la mayoría de los tipos celulares, que se pueden dividir, en base a su biogénesis, en exosomas y micropartículas.

Los exosomas son pequeñas vesículas de aproximadamente 100 nm de diámetro. Estas vesículas se forman por invaginación de la membrana de un tipo de endosoma con características propias denominado cuerpo multivesicular, dando lugar a las vesículas intraluminales que formarán los exosomas. El cuerpo multivesicular realiza una selección de diferentes macromoléculas, entre las que se encuentran proteínas, ácidos ribonucleicos (RNA) mensajeros y miRNA específicos, que son seleccionados a través del sistema ESCRT I (*endosomal sorting complex required for transport I*), permitiendo distintas composiciones de moléculas biológicas en el citoplasma y en el interior de los exosomas(127, 128). Una vez formados los exosomas, el cuerpo multivesicular puede bien unirse al lisosoma para la degradación de su contenido, o bien a la membrana plasmática, liberando los exosomas al exterior celular. En este espacio, los exosomas tienen la posibilidad de unirse de forma paracrina a otras células receptoras. Cuando el exosoma contacta con una célula “receptora”, puede interiorizarse mediante la ruta endocítica, o bien puede producirse una fusión de la membrana de la célula con la membrana del exosoma, liberándose el contenido directamente al citoplasma, aunque los mecanismos moleculares por los que se produce esta última opción no se han descrito aún con detalle, ya que la membrana del exosoma posee características propias(129).

Las micropartículas son otro tipo de microvesículas liberadas por todos los tipos celulares. Aunque comparten algunas características con los exosomas, son mayores sus diferencias que sus similitudes. Su tamaño es muy variable, entre 100nm y 1µm aproximadamente, aunque es muy variable, ya que depende de la célula productora(130). El contenido de las micropartículas es de composición similar al citoplasma, y no existe un sistema de selección específico para su carga. A diferencia de los exosomas, las micropartículas se forman y se liberan por

evaginación de la membrana plasmática. Una vez en el espacio extracelular, las micropartículas son capaces de unirse a las células receptoras mediante la ruta endocítica o mediante fusión de las membranas(129).

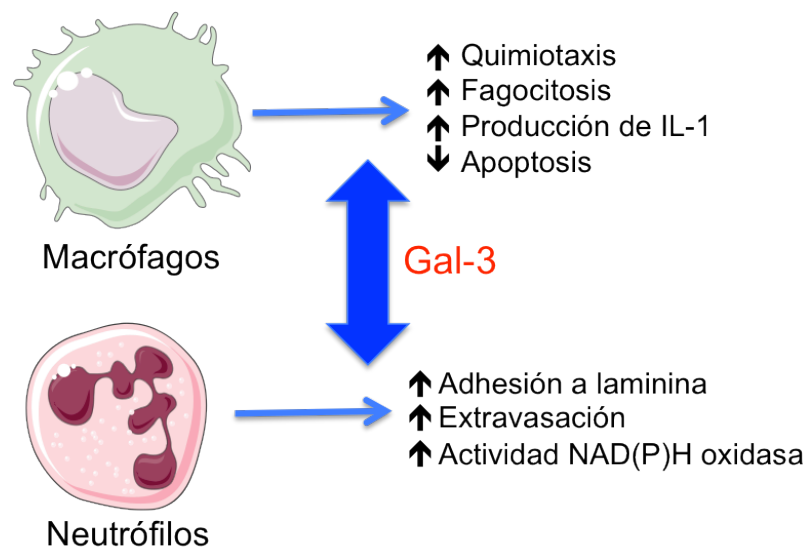
Respecto a su papel en situaciones patológicas, los exosomas se han asociado a la progresión de enfermedades neurodegenerativas(131), de distintos tipos de cáncer(132) y de ECV(133). Estos exosomas se encuentran en mayor cantidad según progresa la enfermedad, por lo que podrían tener una potencial aplicación como biomarcador diagnóstico/pronóstico(133). De forma similar, el número de micropartículas circulantes también se ha descrito como biomarcador de ECV(130). Debido a estas características, y por la posibilidad de aislarlos fácilmente de diferentes fluidos biológicos como el plasma, donde se encuentran en gran cantidad, las microvesículas tienen una potencial aplicación como herramienta en la detección de biomarcadores diagnósticos/pronósticos.

Se ha descrito la participación de exosomas en la mayoría de los procesos implicados en el remodelado vascular patológico. Por ejemplo, los exosomas producidos por linfocitos T activados tienen un alto contenido en colesterol – tanto libre como en forma de ésteres – que es transferido a los macrófagos de la placa de ateroma mediante la fusión de los exosomas, que se produce por el reconocimiento de la fosfatidilserina en la membrana exosomal por parte de los macrófagos y su receptor de fosfatidilserina, promoviendo la acumulación de colesterol y aumentando el tamaño del core lipídico(134). Sin embargo, otros estudios niegan la presencia de fosfatidilserina en las membranas exosomales(135), por lo que asocian este tipo de procesos a otro tipo de microvesículas, como por ejemplo, las micropartículas. Por otra parte, la secreción de exosomas por células endoteliales se ha asociado a procesos ateroprotectores(136). En referencia al AAA, se han descrito potenciales biomarcadores asociados a microvesículas(137), pero todavía no se ha descrito en profundidad ninguna ruta de comunicación mediada por exosomas.



## 5 Galectina-3

Las galectinas son una familia de proteínas presentes en mamíferos altamente conservadas e implicadas en la regulación de la inflamación. Su estructura consiste en monómeros o dímeros de dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD). La galectina-3 (Gal-3) presenta una estructura única en su familia, y es el resultado de una quimera con un dominio CRD y otro dominio que no reconoce carbohidratos y que por lo tanto no se considera lectina. Está implicada en proliferación, quimiotaxis de macrófagos, fagocitosis, extravasación de neutrófilos, estrés oxidativo, apoptosis y angiogénesis(138), todos ellos procesos de gran relevancia en el remodelado vascular patológico (**Figura 4**).



**Figura 4. Galectina-3 ejerce sobre macrófagos y neutrófilos diferentes funciones relacionadas con la respuesta inmunoinflamatoria.**

Galectina-3 no contiene la clásica señal de secreción, y no sigue por lo tanto la ruta habitual a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi para su secreción(138). Sin embargo, su presencia a nivel extracelular sugiere la existencia de un mecanismo de secreción distinto. En este sentido, Gal-3 ha sido previamente asociada a exosomas(139). Su papel como potencial biomarcador circulante de ECV ha sido principalmente evaluado en pacientes de insuficiencia cardíaca (HF)(140), donde sus niveles predicen la mortalidad a 4 años de forma

independiente a los marcadores de ecocardiograma(141). Gal-3 podría estar ejerciendo su función en la fisiopatología de la HF a través de procesos de fibrosis e inflamación, ambos relacionados con el remodelado cardíaco(142), ya que es necesaria para la respuesta inflamatoria y fibrótica mediada por aldosterona en CMLV, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que sugiere que desempeña un papel fundamental en la fibrosis vascular(143). También se ha propuesto que Gal-3 podría estar involucrada en la diferenciación osteogénica de las CMLV(144). En este sentido, numerosas proteínas implicadas en este proceso se encuentran reguladas transcripcionalmente por Runx2, un factor de transcripción que también regula el gen que codifica para Gal-3(145).

Recientemente se ha demostrado que su inhibición – mediante delección génica o mediante intervención farmacológica – detiene la progresión del remodelado cardíaco, atenúa la fibrosis cardíaca y preserva la función ventricular(146). A nivel vascular, Gal-3 ha sido relacionada con la patogénesis de la aterosclerosis experimental(144, 147-150). La reducción de los niveles de Gal-3 mediante silenciamiento génico produce una reducción en el tamaño de la lesión aterosclerótica en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, y este hecho ha sido atribuido principalmente a sus propiedades proinflamatorias(147, 149). La inhibición farmacológica de Gal-3 mediante *Modified citrus pectin* (MCP) ha demostrado reducir el remodelado patológico vascular y cardíaco(150, 151). MCP es un derivado de una pectina que se encuentra en la piel y la pulpa de los cítricos, que contiene fragmentos de la molécula original de pectina y se une al CRD de Gal-3(152), modulando su actividad y alterando las funciones que ejerce en el espacio extracelular como mediador de interacciones intercelulares e inflamación(153). Es un compuesto que se puede administrar por vía oral sin generar toxicidad, y su uso como complemento dietético ha sido aprobado en otros países como Estados Unidos.

## **6 Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)**

La lipocalina 2 (Lcn2) o NGAL (ortólogo en humanos) pertenece a la familia de las lipocalinas, un grupo de proteínas pequeñas de secreción que se caracterizan por su capacidad para unir moléculas hidrófobas pequeñas y activar distintos receptores de la superficie celular, y que muestran una gran diversidad estructural y funcional intra- e interespecie(154). Inicialmente fue descrita como una proteína producida y secretada por células del sistema inmune innato que limita el crecimiento bacteriano disminuyendo la biodisponibilidad de hierro mediante la unión de sideróforos bacterianos(155, 156). Aunque inicialmente su secreción fue asociada a neutrófilos, se sabe que Lcn2 es producida por muchos tipos celulares, entre los que se encuentran hepatocitos, células epiteliales, renales tubulares o CMLV(157). Además del papel en la respuesta inmune, Lcn2 también es un factor de crecimiento relacionado con el metabolismo lipídico, es necesaria para la granulocitosis y la quimiotaxis de neutrófilos, y es necesaria para preservar la actividad gelatinasa (MMP-9) de los neutrófilos(157-159).

Durante la última década, se ha observado que los niveles sistémicos de NGAL se encuentran incrementados en distintas patologías como enfermedad renal(160) y ECV(157). Previamente se ha demostrado que NGAL se encuentra aumentado en neutrófilos circulantes y en plasmas de pacientes de AAA(161), así como en tejido patológico(162), aunque hasta la fecha no hay estudios que hayan examinado si NGAL desempeña alguna función en el AAA. Por otra parte, se ha descrito una relación entre las concentraciones plasmáticas de NGAL y la presencia de aterosclerosis subclínica(163), así como una mayor expresión local de NGAL en la placa de ateroma(164). En este sentido, también se han correlacionado las concentraciones plasmáticas de NGAL con otros biomarcadores como CRP o el recuento de neutrófilos circulantes, asociándose las altas concentraciones plasmáticas de NGAL a un estado inflamatorio y a un peor pronóstico(164, 165). Además, la cantidad de complejos NGAL/MMP-9 plasmáticos es indicadora de una mayor tasa de eventos cardiovasculares(166).



## OBJETIVOS

---



La mayoría de los pacientes con aterotrombosis son asintomáticos y su evolución es impredecible, por lo que existe un gran interés en identificar nuevos biomarcadores que ayuden en el diagnóstico y el pronóstico. Por otra parte, es necesario investigar nuevos mecanismos fisiopatológicos para determinar posibles nuevas dianas terapéuticas en el AAA, ya que no existen tratamientos específicos que sean capaces de detener la progresión de la enfermedad. Para ello, hemos propuesto los siguientes objetivos:

- 1. Analizar la expresión y localización de Gal-3 en la diferenciación monocito-macrófago, así como los mecanismos que regulan su secreción.**
- 2. Determinar la potencial asociación entre los niveles plasmáticos de Gal-3 y la presencia de aterosclerosis subclínica y clínica, así como de AAA.**
- 3. Estudiar la posible relación entre los niveles plasmáticos de Gal-3 y la progresión de aterosclerosis y AAA.**
- 4. Analizar la expresión y localización de Gal-3 en la pared vascular de AAA humano y experimental.**
- 5. Valorar el efecto de la inhibición farmacológica de Gal-3 en el AAA experimental, así como su efecto sobre el reclutamiento de monocitos.**
- 6. Analizar la expresión y localización de Lcn2/NGAL en la pared vascular de AAA humano y experimental.**
- 7. Valorar el efecto de la delección génica y la inhibición farmacológica de Lcn2 en el AAA experimental.**
- 8. Estudiar el potencial terapéutico del anticuerpo anti-Lcn2 sobre el AAA experimental.**





## MATERIAL Y MÉTODOS

---



# 1 Pacientes

## 1.1 Sujetos asintomáticos

Se estudió un grupo de 199 sujetos asintomáticos a los que se les practicó un chequeo general de salud en el Departamento de Medicina Interna de la Universidad Clínica de Navarra, cuyas características clínicas generales se muestran en la **Tabla 1**. Además, los sujetos carecían de antecedentes de enfermedad coronaria, ictus o PAD, y los electrocardiogramas y radiografías torácicas fueron normales. La enfermedad coronaria fue definida mediante historia clínica de infarto de miocardio, angina, uso de nitroglicerina o por historia clínica de cirugía de angioplastia coronaria o de *bypass*. La enfermedad cerebrovascular fue definida mediante ictus, ataque isquémico transitorio o endarterectomía carotídea. Los síntomas de claudicación intermitente fueron descartados mediante cuestionario y entrevista con un médico. Además, se consideraron criterios de exclusión la disfunción renal, la artritis, las enfermedades del tejido conectivo, el abuso de alcohol y el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en las dos semanas previas al estudio. Se practicó una ultrasonografía carotídea a todos los pacientes para determinar el IMT, que fue llevada a cabo por dos especialistas ciegos para la información clínica.

La reproducibilidad de las medidas de IMT se evaluó previamente en 20 individuos que volvieron en dos semanas para una segunda exploración. El coeficiente de correlación entre medidas tomadas por dos observadores fue 0,76 ( $P < 0,001$ ), y 0,82 ( $P < 0,001$ ) entre medidas tomadas por el mismo observador, con coeficientes de varianza de 5% y 10% respectivamente. Además, los sujetos también fueron excluidos del estudio si presentaban aterosclerosis carotídea avanzada, en base a las medidas de IMT ( $>1,7\text{mm}$ ). Las placas de ateroma se definieron como estructuras ecogénicas presentes en la luz del vaso con un área mayor al 50% que la suma de los grosores correspondientes a las capas media e íntima en la zona adyacente. La presencia de factores de riesgo cardiovascular, como diabetes mellitus (DM), HTA, dislipemia, obesidad o tabaquismo fue evaluada. La presión sanguínea fue medida por duplicado en la parte superior del brazo derecho con un esfigmomanómetro de mercurio y con los sujetos sentados. Los sujetos fueron considerados hipertensos si la presión arterial sistólica (SBP) $>139\text{mm Hg}$ , si la

presión arterial diastólica (DBP)>89mm Hg, o si estaban recibiendo tratamiento de fármacos antihipertensivos.

<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>	<b>POBLACIÓN TOTAL (n=199)</b>
Edad (años)	56 (49-62)
Sexo (masculino/femenino %)	84/16
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28 (26,1-31,2)
SBP (mm Hg)	125 (120-140)
DBP (mm Hg)	80 (80-85)
Hipertensión arterial (%)	51
Diabetes mellitus (%)	13
Obesidad (%)	35
Dislipemia (%)	59
Fumador (%)	22
Glucosa (mg/dL)	95 (88-106)
Colesterol Total (mg/dL)	207 (186-236)
Colesterol HDL (mg/dL)	51 (42-62)
Colesterol LDL (mg/dL)	130 (111-158)
Triglicéridos (mg/dL)	96 (72-136)
Creatinina sérica (mg/dL)	0,90 (0,80-1,00)
Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	87,1 (77,7-95,9)
Galectina (mg/dL)	7,3 (5,76-9,75)
Producción de superóxido (RLU/s)	20,5 (12,3-29,0)
IMT carotídeo (mm)	0,65 (0,60-0,75)
hs-CRP (mg/dL)	1,69 (0,82-3,03)
<b>Medicación</b>	
Antihipertensivos (%)	33
Hipoglucémicos orales (%)	9
Estatinas (%)	16

Tabla 1. Características clínicas generales de la población asintomática.

Aquellos sujetos que presentaban antecedentes familiares de DM o niveles glucémicos superiores a 125mg/dL fueron considerados diabéticos. Los pacientes también fueron analizados en base al tabaquismo, considerando fumadores a aquellos sujetos que consumían al menos 10 cigarrillos diarios durante más de un año. Aquellos sujetos que presentaron un índice de masa corporal (BMI)  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  fueron clasificados como obesos. La dislipemia fue definida como la presencia de al menos una de las siguientes características: colesterol total  $> 200 \text{ mg/dL}$ ; LDL  $> 130 \text{ mg/dL}$  o HDL  $< 35 \text{ mg/dL}$ . De acuerdo con las directrices institucionales, los sujetos eran conscientes de la naturaleza de la investigación y dieron su consentimiento para participar. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki, y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad Clínica de Navarra.

## ***1.2 Pacientes con aterosclerosis carotídea***

Se han empleado 158 pacientes que fueron sometidos a endarterectomía carotídea en la Fundación Jiménez Díaz y el Hospital de Galdakao, cuyas características clínicas generales se muestran en la **Tabla 2**. La presencia de factores de riesgo cardiovascular, como DM, HTA, dislipemia o tabaquismo fueron tomados en consideración. Los pacientes fueron considerados diabéticos si se encontraban siguiendo algún tratamiento (dieta supervisada, medicación oral hipoglucémica e insulina), una glucemia basal superior a 120mg/dL y/o hemoglobina glicosilada superior al 6,5%. La HTA fue definida como SBP  $> 140 \text{ mm Hg}$  y/o DBP  $> 90 \text{ mm Hg}$  en una toma realizada después de que el paciente llevara al menos 30 minutos sentado, o si el paciente ya estaba tomando medicación hipotensiva. La dislipemia fue definida como la presencia de al menos una de las siguientes características: colesterol total  $> 200 \text{ mg/dL}$ ; LDL  $> 130 \text{ mg/dL}$ ; triglicéridos  $> 200 \text{ mg/dL}$ ; el participante ya estaba medicado con estatinas o fibratos. El tabaquismo se definió como fumadores (al menos 10 cigarrillos al día durante más de un año) o no fumadores (incluyendo exfumadores que llevaran al menos 6 meses sin fumar en el momento de iniciar el estudio). El estudio ha sido llevado a cabo de acuerdo a los principios estipulados en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación en Humanos del Instituto de Investigación Sanitaria-

Fundación Jiménez Díaz Universidad Autónoma. Todos los participantes aportaron un consentimiento informado por escrito. También se reclutaron 115 sujetos control sin estenosis carotídea de un programa de *screening* para aterosclerosis carotídea y AAA entre hombres de 65 años. La ausencia de enfermedad vascular en estos sujetos fue confirmada mediante examen físico y ultrasonografía.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	CONTROLES (n=115)	ATEROSCLEROSIS (n=158)
Sexo (masculino/ femenino %)	100/0	82/18
Edad media (IQR años)	65 (64,9-65,1)	70 (62-76)
Dislipemia (%)	64	29
Fumador actual (%)	50	34
Diabetes (%)	38	15
HTA (%)	48	82

Tabla 2. Características clínicas generales de la población de aterosclerosis carotídea.

### 1.3 Pacientes con PAD

Se reclutaron 309 pacientes con claudicación intermitente o isquemia en las extremidades inferiores, de forma prospectiva a partir de un ensayo clínico(167). Las características clínicas generales de la población se muestran en la **Tabla 3**. Sesenta y siete pacientes (22%) fallecieron durante los primeros cinco años. La PAD fue diagnosticada durante un examen clínico. Se empleó el índice tobillo-brazo (ABI) que resultó menor entre el de ambas piernas para el análisis. Los casos de isquemia de las extremidades inferiores fueron excluidos. El seguimiento de los pacientes fue durante cinco años, con una mediana de 4,31±1,52 años. Las muertes debidas a cualquier causa cardiovascular fueron reportadas en el registro nacional danés. Se registró un exhaustivo historial clínico de todos los pacientes, incluyendo detalles de infartos de miocardio previos, historia de angina de pecho, HTA, enfermedad cerebrovascular previa, tabaquismo, DM y la SBP tobillo-brazo. La información se obtuvo a partir de los registros elaborados por los cualitativos o directamente de los pacientes. Fueron considerados fumadores aquellos pacientes

<b>VARIABLES INDEPENDIENTES</b>	<b>%</b>
Sexo (masculino/femenino)	60,5/39,5
Fumador	60,5
DM	14,2
HTA	49,5
Eventos cerebrovasculares isquémicos	9,7
Infarto agudo de miocardio	13,3
Angina de pecho	23,0
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	9,9
Hiperlipidemia	37,7
Uso de dosis baja de aspirina	57,8
Uso de warfarina	5,0
Uso de $\beta$ -bloqueantes	18,8
Uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	18,1
Uso de antagonistas de calcio	21,6
Uso de estatinas	19,9
Isquemia crónica crítica	50,9
	<b>MEDIANA (IQR)</b>
Edad (años)	67,1 (62,1-72,1)
SBP (mm Hg)	144 (130-160)
DBP (mm Hg)	78 (70-85)
Presión del pulso (mm Hg)	65 (55-80)
Altura (m)	1,70 (1,65-1,75)
Peso (kg)	71,5 (60,0-80,0)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,5 (22,0-27,5)
Máxima distancia caminada (m)	100 (11,5-200)
Mínima presión arterial tobillo-brazo	0,78 (0,55-1,00)
Colesterol total	5,20 (4,40-6,10)
hs-CRP	11,0 (3,27-39,7)
S-Galectina 3	4,75 (2,47-14,7)

Tabla 3. Características clínicas generales de la población de PAD.

que fumaban activamente, o aquellos que lo hicieran de forma interrumpida durante dos años. La DM se definió por historia previa de la enfermedad o por el uso de fármacos antidiabéticos y/o insulina. La HTN se definió por el uso previo de fármacos antihipertensivos empleados con esa indicación. En las altas hospitalarias se reportó cualquier historia clínica previa de infarto de miocardio, angina de pecho y enfermedad cerebrovascular asociada a ictus, ataque isquémico agudo o reconstrucción carotídea, basándose en los códigos para la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD); ICD-8 antes de 1994 e ICD-10 a partir de entonces. El estudio fue aprobado por los comités éticos de investigación de los condados de North Jutland, Viborg y Aarhus (Dinamarca).

#### ***1.4 Pacientes con AAA***

Las características clínicas generales de la población se muestran en la **Tabla 4**. Se obtuvo plasma de los pacientes a partir de muestras de sangre venosas recogidas en tubos con heparina. Los tubos fueron centrifugados durante 12 minutos a 3000xg para recoger el plasma, que fue alicuotado y congelado inmediatamente a -80°C. Las muestras de plasma se obtuvieron de pacientes de AAA durante el seguimiento (tamaño aórtico < 5cm; n=153) o en el momento de la cirugía (tamaño aórtico > 5-5,5cm; n=75). Además se obtuvieron plasmas de 30 sujetos control (tamaño aórtico < 3cm; n=100). Todas las muestras fueron obtenidas en Odense, y se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes antes de su participación. El estudio fue aprobado por el Comité Ético Local de la Región Central de Dinamarca y llevado a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki.



<b>VARIABLES DICOTÓMICAS</b>	<b>CONTROLES (n=100)</b>	<b>AAA (n=225)</b>	<b>P</b>
<b>Predisposición familiar</b>	3,5	6,7	0,289
<b>Fumador actual</b>	18,2	40,2	P<0,001
<b>DM</b>	13,8	14,2	0,952
<b>HTA</b>	44,8	51,8	0,231
<b>Uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina</b>	17,0	28,2	0,046
<b>Uso de β-bloqueantes</b>	26,1	32,0	0,251
<b>Uso de β-agonistas</b>	8,0	7,8	0,951
<b>Uso de estatinas</b>	31,8	48,2	0,003
<b>Uso de antiagregantes</b>	22,7	44,2	P<0,001
<b>PAD</b>	0,0	26,6	P<0,001
<b>VARIABLES CONTINUAS Media (Desviación típica)</b>	<b>CONTROLES (n=100)</b>	<b>AAA (n=225)</b>	<b>P</b>
<b>BMI</b>	2,4 (3,2)	27,4 (3,7)	0,017
<b>SDP (mm Hg)</b>	148,2 (19,6)	154,7 (22,5)	0,012
<b>DBP (mm Hg)</b>	79,8 (9,7)	88,3 (11,9)	<0,001
<b>hs-CRP</b>	5,57 (13,5)	6,03 (8,48)	0,779
<b>Diámetro aórtico</b>	17,8 (2,4)	44,3 (14,3)	<0,001
<b>Gal-3</b>	6,93 (2,8)	7,78 (3,6)	0,008

Tabla 4. Características clínicas generales de la población de AAA.

## **2 Muestras de tejido humano**

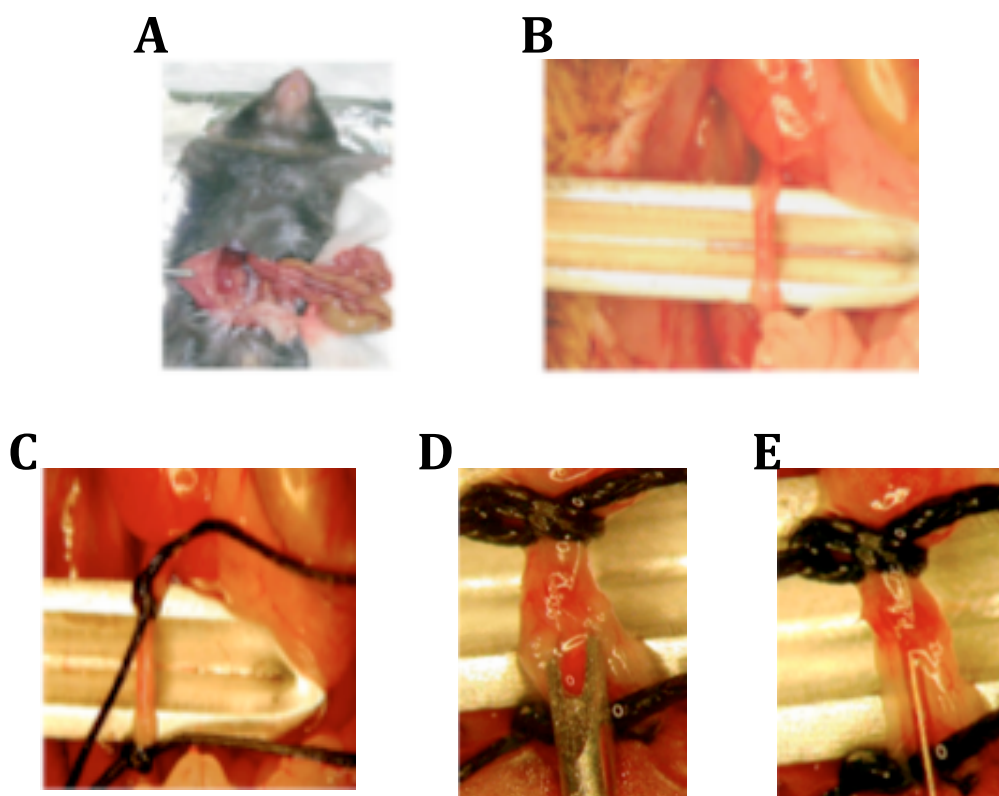
Se obtuvieron aortas humanas sanas (n=11) a partir de donantes de órganos fallecidos, con la autorización de la Agencia Francesa de Biomedicina (PFS 09-007). Las aortas eran normales a nivel macroscópico y no presentaban lesiones ateromatosas tempranas. También se obtuvieron muestras de pared de AAA (n=9) a partir de pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente, y que fueron reclutados en el protocolo RESAA(168). Se obtuvo consentimiento informado del uso de muestras humanas para su investigación, y todos los estudios se desarrollaron de acuerdo a las directrices estipuladas en la Declaración de Helsinki.

## **3 Ratones**

Los ratones control *wild type* (WT; cepa C57Bl6/J) fueron adquiridos a The Jackson Laboratory. Los ratones *Lcn2<sup>-/-</sup>* fueron proporcionados por el Dr. Tak W. Mak (Campbell Family Institute for Breast Cancer Research, Toronto), y no mostraron diferencias de peso o tamaño con respecto a los WT. Todos los animales fueron estabulados en habitaciones adecuadas del animalario de nuestra institución. Los procedimientos animales realizados fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de nuestra institución, y el proyecto fue autorizado por el Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma de Madrid (CEI 59-1036-A061) y por la Comunidad Autónoma de Madrid (10/008932.9/15). Todos los procedimientos animales se realizaron de acuerdo a las directrices de la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo para la protección de animales en su uso en investigación, a la Recomendación 2007/526/EC y al Real Decreto 53/2013.

### 3.1 Inducción del AAA experimental

Se emplearon ratones machos de 12 semanas, que fueron anestesiados por inhalación de isofluorano (Forane, Arkema) al 2%. Se les practicó una laparotomía horizontal (**Figura 1A**) y la aorta abdominal fue separada al nivel de la vena renal izquierda en la bifurcación (**Figura 1B**), y temporalmente ligada entre las arterias renal e ilíaca (**Figura 1C**). Se realizó una aortotomía con una aguja 30g y la aorta fue exanguinada (**Figura 1D**). Se introdujo un tubo de polietileno PE-26 a través de la aortotomía (**Figura 1E**) y la aorta fue perfundida con suero salino (control) o con elastasa pancreática porcina de tipo I (actividad específica 6,8U/mg proteína; E1250; Sigma Chemical) durante 5 minutos a 100mm Hg. Tras la perfusión, la aortotomía fue reparada y la ligadura eliminada. Además, se confirmó visualmente la restauración del flujo sanguíneo. Las incisiones practicadas fueron entonces cerradas y los animales se estabularon en condiciones estándar. Catorce días después de la cirugía, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina

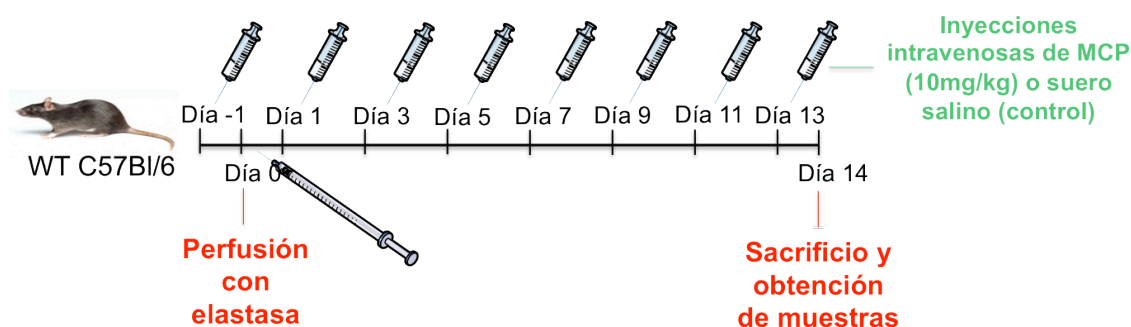


**Figura 1. Inducción del AAA experimental murino mediante perfusión con elastasa. A.** Laparotomía horizontal. **B.** Aorta abdominal separada al nivel de la vena renal izquierda en la bifurcación. **C.** Ligadura temporal entre las arterias renal e ilíaca. **D.** Aortotomía con una aguja 30g. **E.** Tubo de polietileno PE-26 a través de la aortotomía para perfundir con elastasa.

(Pfizer; 125 mg/kg) e hidrocloreuro de xilacina (Bayer; 25 mg/kg), se les extrajo sangre por vía retrorbital y se les practicó la eutanasia. Posteriormente, se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero salino y se recogieron las muestras de tejido aórtico para su análisis histológico.

### 3.2 *Inhibición de Gal-3*

Se diseñaron dos grupos experimentales, a los que se les practicó la cirugía experimental y se inyectaron de forma intravenosa y en días alternos con MCP (10mg/kg, amablemente proporcionado por el doctor R.A. Boer; n=14) o con suero salino (control; n=17; **Figura 6**). Adicionalmente, se emplearon cohortes de ratones WT perfundidos con elastasa (n=6) y ratones WT sanos (sin cirugía; n=9) para aislamiento de RNA de las aortas y de suero de sangre periférica.

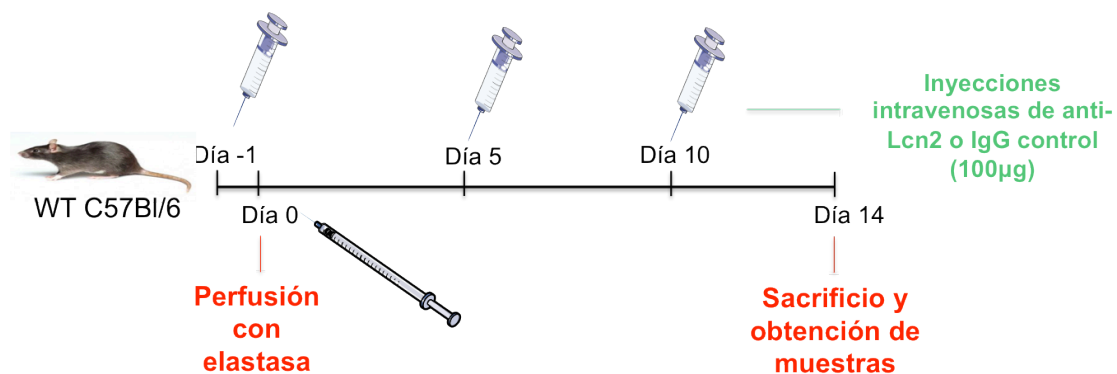


**Figura 6. Inhibición de Gal-3 mediante MCP en ratones perfundidos con elastasa.** Los ratones fueron inyectados con MCP (10mg/kg, n=14) o suero salino (control, n=17) a días alternos desde el día anterior a la perfusión con elastasa (día -1), y sacrificados para la obtención de muestras 14 días después de la perfusión con elastasa.

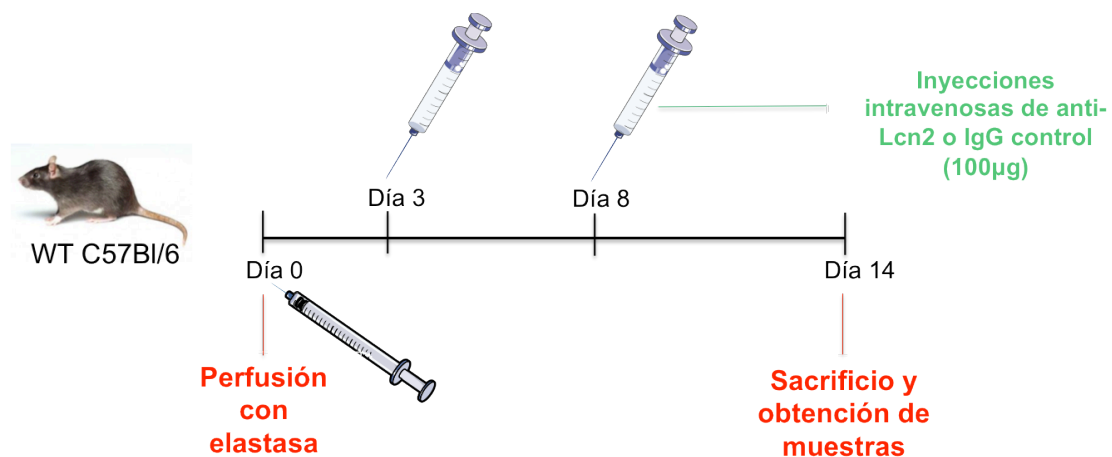
### 3.3 *Inhibición de Lcn2*

Para el modelo de inhibición génica, se diseñaron grupos experimentales de ratones WT y *Lcn2*<sup>-/-</sup> perfundidos con elastasa (n=12 y n=11 respectivamente) y ratones WT y *Lcn2*<sup>-/-</sup> perfundidos con suero salino (*sham*; n=6 para ambos grupos). Para el modelo de inhibición farmacológica (**Figura 7**), los ratones WT fueron inyectados de forma intravenosa con 100µg del anticuerpo anti-Lcn2 (n=11) o con IgG (control; n=8) 24 horas antes de la cirugía experimental, y en los días 5 y 10

tras la cirugía. En el modelo terapéutico (**Figura 8**), también se emplearon dos grupos inyectados con 100 $\mu$ g de anti-Lcn2 o IgG control (n=8 para ambos), pero las inyecciones se realizaron el tercer y octavo día después de la cirugía. Adicionalmente, se emplearon cohortes de ratones WT perfundidos con elastasa (n=6) y ratones WT sanos (sin cirugía; n=9) para aislamiento de RNA de las aortas, y de ratones WT tras 3 días de la perfusión con elastasa (n=6) para la obtención de leucocitos circulantes.



**Figura 7. Inhibición de Lcn2 mediante administración preoperatoria de anti-Lcn2 en ratones perfundidos con elastasa.** Los ratones fueron inyectados con anti-Lcn2 (100 $\mu$ g, n=11) o IgG (control, n=8) el día anterior (día -1), y los días 5 y 10 tras la perfusión con elastasa. El sacrificio y la obtención de muestras se realizó 14 días después de la perfusión con elastasa.



**Figura 8. Inhibición de Lcn2 mediante administración terapéutica de anti-Lcn2 en ratones perfundidos con elastasa.** Los ratones fueron inyectados con anti-Lcn2 (100 $\mu$ g, n=8) o IgG (control, n=8) los días 3 y 8 tras la perfusión con elastasa. El sacrificio y la obtención de muestras se realizó 14 días después de la perfusión con elastasa.

### **3.4 Generación y purificación del anticuerpo policlonal anti-Lcn2**

Se empleó un conejo New Zeland White de 8 semanas de edad para obtener el anticuerpo policlonal anti-Lcn2. El animal fue inmunizado durante 6 semanas mediante inyección intramuscular de 100mg de Lcn2 murina recombinante (Sino Biological, 50060-M08H) diluida en 200mL de PBS con 350mL de adyuvante completo de Freund. Tras el periodo de inmunización, el conejo fue sangrado por la vena marginal de la oreja derecha. La sangre fue recogida e incubada durante una hora a 37°C y hasta el día siguiente a 4°C para inducir la coagulación. El suero se recogió mediante centrifugación a 3000rpm durante 15 minutos, y la fracción correspondiente a las inmunoglobulinas (IgG) fue purificada mediante diálisis en PBS y cromatografía en columnas de Sepharosa unidas a la proteína A (GE Healthcare). La IgG control se obtuvo de un suero control, a partir de un conejo sin inmunizar y siguiendo el mismo protocolo. Tras la obtención de la fracción, purificada, se procedió a la titulación del anticuerpo en placas de 96 pocillos (Immunolon 4HBX, Thermo) tapizadas con 0,5mg de proteína recombinante. Se testaron diluciones seriadas (de 1/500 a 1/1.000.000) del suero anti-Lcn2, que fueron incubadas con anticuerpo secundario conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch). La detección de las IgG fue realizada mediante la adición del reactivo TMB (Chemicon) y medida de absorbancia a 620nm.

## **4 Cultivos celulares**

### **4.1 Líneas celulares**

La línea celular de monocitos humanos THP-1 fue adquirida a ATCC (CRL-1593), y fue cultivada en RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma-Aldrich) de complementado mediante incubación a 65°C durante 30 minutos, penicilina 100U/mL (Sigma-Aldrich), estreptomycin 100µg/mL (Sigma-Aldrich) y L-Glutamina 2mM (Sigma-Aldrich). Para los experimentos, las células fueron incubadas sin FBS durante 24 horas. El forbol

miristato acetato (PMA), y el inhibidor apocinina empleados en los experimentos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. Las células siempre se mantuvieron a a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **4.2 Cultivos primarios**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron a partir de sangre de voluntarios sanos mediante un gradiente de densidades a base de ficoles (Histopaque-1119 e Histopaque-1077, Sigma Aldrich). Los monocitos fueron aislados a partir de los PBMC mediante separación celular por activación magnética usando *microbeads* conjugadas al anticuerpo anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec). Los monocitos CD14<sup>+</sup> se mantuvieron en cultivos en suspensión durante 16 horas en RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS decomplementado mediante incubación a 65°C durante 30 minutos, penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL y L-Glutamina 2mM. Durante la estimulación, el FBS se redujo al 0,5%. Las células siempre se mantuvieron a a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

Las CMLV murinas fueron aisladas a partir de aortas de ratones WT y Lcn2<sup>-/-</sup>. Para ello los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina e hidrocloreuro de xilacina, y después se les practicó la eutanasia. Las aortas fueron perfundidas con suero salino, extraídas y lavadas en PBS (tampón fosfato salino) suplementado con penicilina 100U/mL y estreptomina 100µg/mL. La grasa y el tejido conectivo periférico son separados de la porción torácica de las aortas en condiciones de esterilidad. Las aortas son entonces troceadas en fragmentos de aproximadamente 1mm e incubadas en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado con colagenasa porcina tipo II 290U/mg, penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL y L-Glutamina 2mM durante 1 hora a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después se lavaron las aortas tres veces en DMEM suplementado con FBS 20%, penicilina 100U/mL, estreptomina 100µg/mL y L-Glutamina 2mM, y se sembraron en este mismo medio hasta que fueron utilizadas para los experimentos, que se realizaron en medio sin FBS.

## **5 Análisis histológico**

Las muestras de aortas – tanto humanas como murinas – fueron incluidas en OCT (*Optimum cutting temperature*, Sakura) o parafina, y posteriormente se obtuvieron cortes seriados de 4µm. Las muestras de cada animal fueron examinadas de forma ciega. Todas las preparaciones fueron visualizadas mediante microscopía óptica (DMD108, Leica), y los resultados fueron analizados con Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics), manteniendo el mismo umbral para todas las imágenes.

### **5.1 Tinciones**

El tricrómico de Masson se realizó mediante kit comercial de Bio Optica. La tinción de Verhoeff van Gieson (kit de tinción de elásticas HT25A-1KT, Sigma-Aldrich) se realizó para determinar el grado de preservación de las capas de elastina, que se analizó mediante la siguiente clasificación: 1, intacto, láminas bien organizadas; 2, láminas elásticas con algunas roturas e interrupciones; 3, láminas de elastina con múltiples roturas e interrupciones; 4, fragmentación severa de la elastina y/o pérdida de secciones completas.

### **5.2 Análisis histomorfométrico**

Se realizó sobre una tinción de tricrómico de Masson. El perímetro de la pared vascular murina fue medido. A partir de esta medición se calculó el radio de la aorta y el incremento de diámetro, considerando que una aorta perfundida con suero salino (NaCl 0,9%) tiene un diámetro de 0,4mm.

### **5.3 Inmunohistoquímica**

Las muestras incluidas en parafina fueron fijadas durante 1 hora a 60°C, y posteriormente se realizó la exposición antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics) con tampón citrato sódico 10mM ajustado a pH 9 para Gal-3 en



humanos o pH 6 para el resto. Las muestras incluidas en OCT fueron fijadas con paraformaldehído durante 2 minutos y no se sometieron a ningún proceso de exposición antigénica. La peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras durante 20 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, mientras que las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 4% y suero de la misma especie en que se produjo el anticuerpo secundario al 5% en PBS. Posteriormente se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C. Para los estudios de colocalización se emplearon cortes seriados. Los anticuerpos primarios se detallan en la **Tabla 5**. Tras lavar con PBS con Tween-20 al 0,4%, se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron entonces lavadas de nuevo de e incubadas con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP system; Vector laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se revelaron utilizando DAB (3,3'-diaminobencidina, Dako) como sustrato, se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron, se fijaron en xilol y se montaron con medio DPX (Eukitt, Chem Lab). Los resultados se expresaron como el porcentaje del área positiva respecto al área total para Iba-1 y CCL-2, como células positivas/mm<sup>2</sup> de la lesión completa para Ly6G o como neovasos positivos/ mm<sup>2</sup> de la lesión completa para CD31.

Proteína	Reactividad	Huésped	Dilución	Casa comercial (clon)
<b>Gal-3</b>	Humano	Conejo	1:250	Abcam (116708)
<b>Gal-3</b>	Ratón	Conejo	1:250	Abcam (EP2775Y)
<b>CD68</b>	Humano	Ratón	No	Dako (PG-M1)
<b>IBA-1</b>	Ratón	Conejo	1:1000	Wako
<b>CCL-2</b>	Ratón	Cabra	1:30	Santa Cruz (R-17)
<b>Ly6G</b>	Humano, ratón	Rata	1:10	Biolegend (1A8)
<b>NGAL/Lcn2</b>	Humano, ratón	Cabra	1:100	R&D (AF1757)
<b>CD31</b>	Ratón	Rata	1:50	BD Pharmigen (MEC13.3)

**Tabla 5. Información general sobre los anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica.**

#### **5.4 Inmunofluorescencia**

La detección de CMLV se realizó mediante marcaje con  $\alpha$ -actina (clon 1A4, Sigma) conjugado a cianina 3 (Cy3). El resultado se analizó en base a la pérdida de células de acuerdo a los siguientes grados: 1, intacta, células bien organizadas; 2, alteraciones mínimas en las CMLV; 3, alguna interrupción en las CMLV y cierta desorganización; 4, pérdida severa de CMLV y desorganización marcada.

### **6 Análisis de la expresión génica**

Las muestras de aortas murinas fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente homogeneizadas. El RNA total – tanto de tejido como de cultivos celulares – se obtuvo mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen). Todas las muestras fueron cuantificadas mediante absorbancia a 260nm para la reacción de retrotranscripción, que se realizó a partir de 1 $\mu$ g o la máxima cantidad posible en su defecto usando el High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) y las siguientes condiciones: 10 min a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C. La qPCR (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real) se realizó en un sistema de detección secuencial ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando el método  $\Delta\Delta C_t$ .

#### **6.1 SYBR Green**

La cuantificación de Gal-3 se realizó mediante amplificación del cDNA en reacción *uniplex* con SYBR Premix (Takara Bio) y los *primers* que se detallan (**Tabla 6**). Los niveles se normalizaron respecto al gen 18S. La secuencia del programa de qPCR con SYBR Green consistió en un paso inicial de 5 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C, durante el cual el sistema recogió la información de fluorescencia emitida. Finalmente se realizó un ciclo de disociación de *primers* para descartar cualquier amplificación inespecífica. Todos los

experimentos se realizaron por triplicado, y los niveles de expresión se cuantificaron de forma relativa a la condición basal o a las aortas sanas.

Gen	Especie	Primer directo (5'-3')	Primer reverso (5'-3')
18S	Eucariotas	CCGTCGTAGTTCCGACCATAA	CAGCTTTGCAACCATACTCCC
Gal-3	Humano	TTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCT	TGGGCTTCACCGTGCCAGAA
Gal-3	Ratón	GCTTATCCTGGCTCAACTGC	TTCAGTGTGCCCATGATTGT

Tabla 6. Primers empleados para el análisis de la expresión génica

## 6.2 Sondas Taqman

La amplificación de Lcn2, NGAL y MMP se realizó en reacción *multiplex* con Taqman Premix (Takara Bio) y las siguientes sondas (Applied Biosystems; **Tabla 7**) y se normalizó respecto al gen 18S en muestras humanos o GAPDH en muestras murinas. La secuencia del programa de qPCR con sondas Taqman consistió en un paso inicial de 5 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, durante el cual el sistema recogió la información de fluorescencia emitida. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los niveles de expresión se cuantificaron de forma relativa a la condición basal o a las aortas sanas.

Gen	Especie	Referencia
18S	Eucariotas	4310893E
NGAL	Humano	Hs01008571_m1
GAPDH	Ratón	Mm99999915_g1
Lcn2	Ratón	Mm01324470_m1
MMP-2	Ratón	Mm00439498
MMP-3	Ratón	Mm00440295
MMP-9	Ratón	Mm00442991
MMP-13	Ratón	Mm00439491

Tabla 7. Sondas Taqman empleadas para el análisis de la expresión génica

## 7 Análisis de proteínas

Las proteínas totales de tejido o células se extrajeron empleando una solución compuesta por tris(hidroximetil)aminometano (Tris)-HCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 2mM, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético (EGTA) 2mM, NaF 25mM, Tritón X-100 0,2% (v/v), nonil fenoxipolietoxietanol 40 (NP-40) 0,3% (v/v) suplementado con Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1% (v/v) y un cocktail de inhibidores de proteasas (cOmplete™, Roche Diagnostics). La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método del BCA (ácido bicinconínico, Pierce).

### 7.1 Western blot

Para los sobrenadantes y los extractos de exosomas, se resolvieron volúmenes iguales de cada muestra. Para los extractos celulares, se prepararon alícuotas de 20µg de cada muestra en volúmenes iguales de tampón de Laemmli suplementado con β-mercaptoetanol 100mM, y se desnaturalizaron en condiciones reductoras (95°C durante 5 minutos). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (p/v) con SDS (dodecil sulfato sódico) y transferidas a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno, Millipore) previamente activadas con metanol durante 45 minutos a 20V. Las membranas fueron entonces bloqueadas con tampón Tris-salino (TBS) con Tween-20 al 0,4% (v/v) y leche desnatada en polvo al 10% (p/v) durante 30 minutos y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes toda la noche a 4°C (**Tabla 8**). Las membranas fueron lavadas entonces repetidamente e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a la peroxidasa de rábano (HRP). La visualización de las proteínas se efectuó mediante el reactivo Luminata Crescendo (Millipore) en un sistema ImageQuant Las 4000 (GE Healthcare Biosciences).

Proteína	Reactividad	Huésped	Dilución	Casa comercial (clon)
TSG101	Humano	Ratón	1:1000	Abcam (4A10)
ALIX	Humano	Ratón	1:1000	Santa Cruz (G-10)
NGAL/Lcn2	Humano, ratón	Cabra	1:1000	R&D (AF1757)

Tabla 8. Información general sobre los anticuerpos primarios empleados en western blot.

## 7.2 *ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)*

La detección colorimétrica se realizó mediante adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y medida de la absorbancia a 620nm en un espectrofotómetro lector de placas TECAN. Las concentraciones de Gal-3 soluble se cuantificaron en exosomas, sobrenadantes de células y plasmas mediante kits comerciales en humanos (eBioscience; DGAL30, R&D) y en ratones (ELM-Galectin3, Raybiotech).

## 8 Aislamiento y caracterización de exosomas

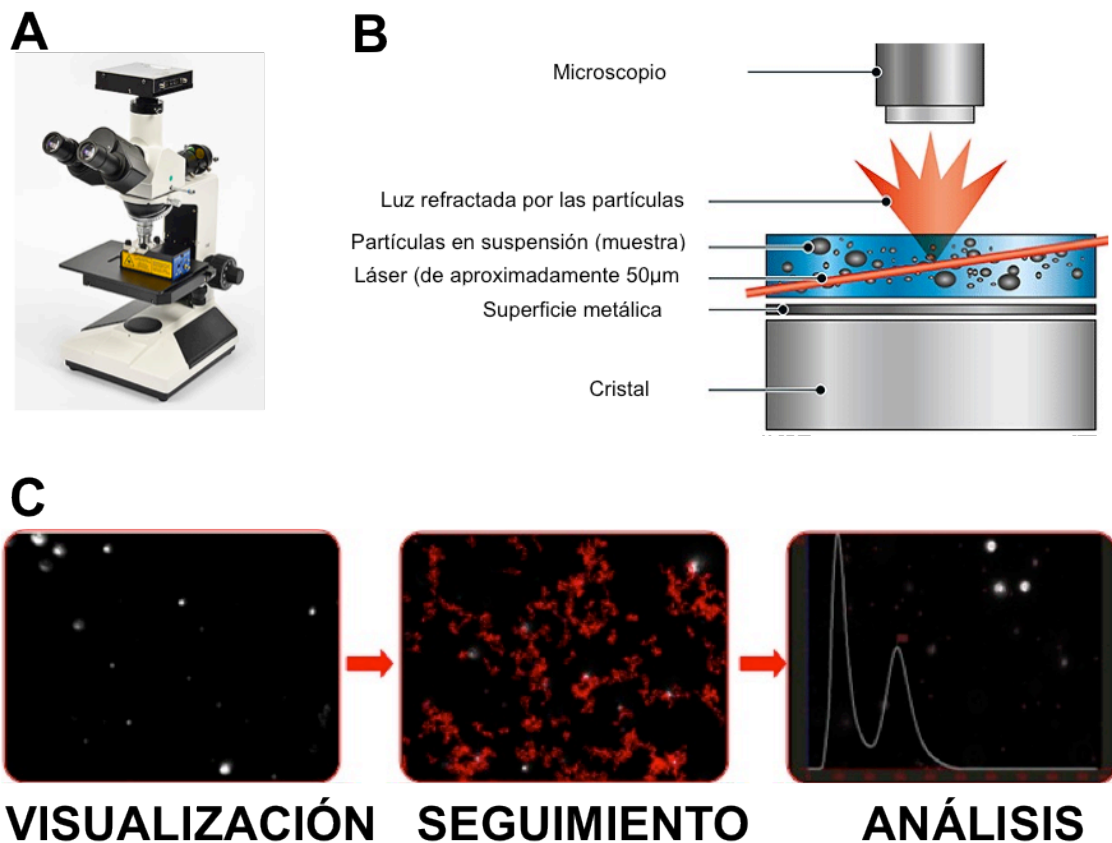
### 8.1 Aislamiento

Los exosomas fueron aislados a partir del medio condicionado de monocitos CD14<sup>+</sup> o THP-1 (10<sup>6</sup> células) o de plasma (1ml). Se obtuvieron plasmas de 10 pacientes de aterosclerosis carotídea y de 10 controles seleccionados al azar entre la población descrita anteriormente. Los sobrenadantes de las células fueron centrifugados a velocidades crecientes para descartar células (5 minutos a 300xg), células muertas (10 minutos a 3000xg), y *debris* celular (30 minutos a 17.000xg). El sobrenadante resultante fue centrifugado durante toda la noche a 100.000xg para obtener la fracción correspondiente a los exosomas. Esta fracción fue lavada repetidamente en PBS, y después resuspendida en tampón de lisis para análisis por western blot, en PBS con EDTA 50mM para análisis del seguimiento de nanopartículas

(*Nanoparticle tracking analysis, NTA*) o en paraformaldehído para su análisis mediante microscopía electrónica.

## 8.2 *Análisis del seguimiento de nanopartículas (NTA)*

NTA es un sistema que permite caracterizar partículas de hasta 10nm de tamaño. La muestra se inyecta en una cámara sobre la que incide un láser. Esta cámara está acoplada a un microscopio óptico (**Figura 9A**) que permite visualizar la refracción de la luz sobre las partículas (**Figura 9B**). Esta técnica realiza un seguimiento individual de cada partícula, pero se analizan todas de forma simultánea (**Figura 9C**). Esto permite por una parte medir la concentración de partículas de la muestra, y en base a la difusión de las partículas por el movimiento browniano y al coeficiente de difusión del medio, también permite determinar el tamaño de las partículas visualizadas.



**Figura 9. Seguimiento de análisis de micropartículas.** A. Fotografía del Nanosight (cámara acoplada al microscopio óptico). B. Cámara del Nanosight y representación esquemática de su funcionamiento. C. Visualización de la luz refractada por las nanopartículas, seguimiento del movimiento que realizan y análisis de su número y tamaño en base al movimiento, la temperatura y la viscosidad del medio.

### **8.3 Microscopía electrónica**

Tras ser fijados en paraformaldehído, la muestra se incluyó en rejillas de microscopía electrónica recubiertas de formvar/carbono. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio JEM-1000 (Jeol) a 100kV, revelando la presencia de vesículas de aproximadamente 100nm consistentes con exosomas.

### **8.4 Marcadores proteicos**

Se realizaron western blots de marcadores específicos de exosomas como TSG101 (*Tumor susceptibility gene 101*) y ALIX.

## **9 Determinación de la producción de anión superóxido**

La producción de anión superóxido dependiente de la NADPH oxidasa fue medida empleando una concentración de lucigenina 5 $\mu$ M (Sigma-Aldrich) en  $4 \times 10^5$  PBMC aislados de sangre periférica con Lymphoprep (Nycomed Pharma) o de  $10^6$  THP-1 bajo condiciones basales y de estimulación con PMA 3,2 $\mu$ M durante 1 hora o 30 minutos respectivamente. Las medidas de luminiscencia fueron registradas al menos cada 30 segundos durante una hora, en un luminómetro lector de placas (Luminoskan Ascent; Thermo Labsystems). Para cuantificar la luminiscencia, se empleó el área bajo la curva (AUC) y se restó de cada lectura el blanco correspondiente al buffer empleado para el experimento.

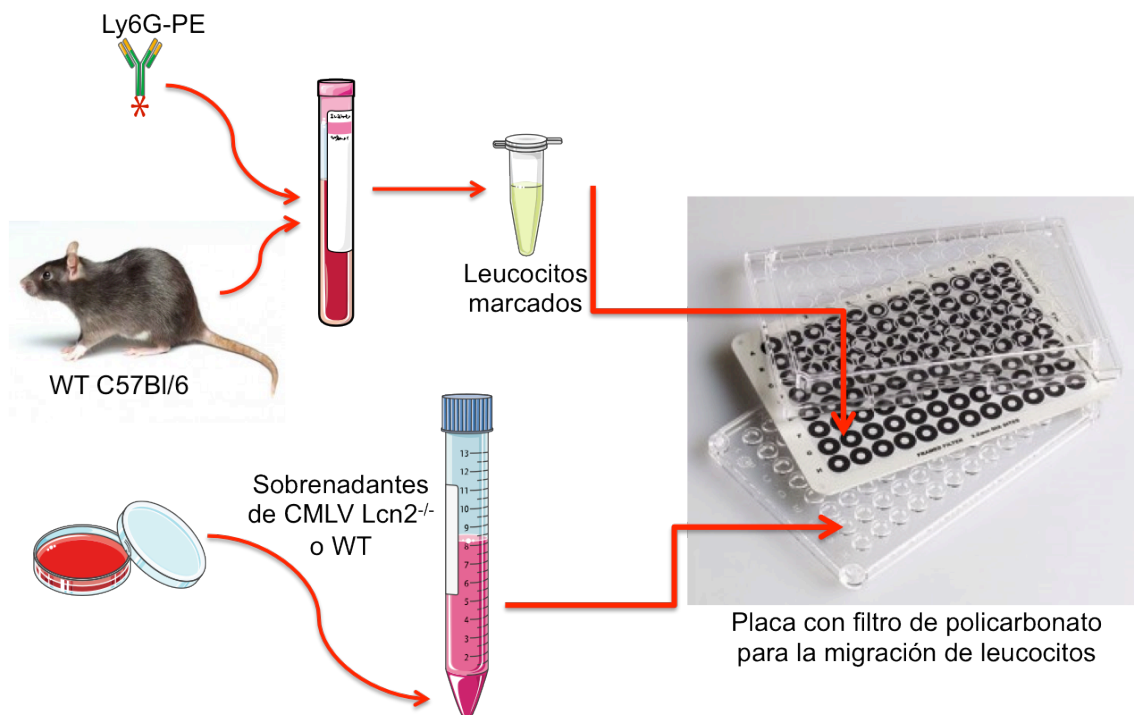
## **10 Tomografía molecular fluorescente (FMT)**

Para poder detectar la actividad MMP asociada al remodelado aórtico, los ratones fueron inyectados con la sonda fluorescente MMPsense-680 (Visen; 33nM) un día antes de la eutanasia. Tras el sacrificio, las aortas fueron visualizadas mediante FMT (FMT 290 1500 VisEn Medical, PerkinElmer). La actividad MMP en las imágenes de la FMT fueron analizadas con FMT1500 *software package* (Perkin Elmer).

## **11 Ensayos de quimiotaxis**

Los leucocitos se aislaron de sangre de ratones WT (n=6) tras el tercer día de la perfusión con elastasa. Se recogieron 800µL de sangre en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; Vacutainer) y se incubaron con 10 volúmenes de tampón de lisis para eritrocitos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5mM, EDTA). Los leucocitos fueron lavados repetidamente en medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma) y posteriormente marcados con anti-Ly6G conjugado a ficoeritrina (PE; clon 1A8, Biolegend, dilución 1:50). La concentración de células fue ajustada mediante una curva realizada con diluciones seriadas de las propias células. El ensayo de migración fue realizado en placas con filtros de policarbonato de 8µm (ChemoTX, Neuroprobe). Se pipeteó en cada pocillo 300µL de medio condicionado procedente de células de músculo liso vascular WT o Lcn2<sup>-/-</sup> (n=3 para ambos). En la parte superior del filtro se pipetearon 29µL (30.000 células) de las preparaciones de leucocitos marcadas con Ly6G-PE y se incubó la placa durante 2 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Tras la incubación, el filtro fue retirado cuidadosamente y el sobrenadante fue recuperado para su análisis mediante citometría de flujo (FACS Canto II, BD Bioscience). El protocolo se muestra esquematizado en la **Figura 10**. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y los valores se expresaron como porcentaje de células Ly6G<sup>+</sup> migradas.





**Figura 10. Ensayo de quimiotaxis de neutrófilos en respuesta a sobrenadantes de CMLV Lcn2<sup>-/-</sup> y WT.** Se extrajo sangre de ratones WT y fue marcada con anti-Ly6G-PE. Los eritrocitos fueron lisados, y los leucocitos marcados se colocaron sobre un filtro en contacto directo con una placa en la que previamente se dispusieron sobrenadantes de CMLV Lcn2<sup>-/-</sup> y WT. El sobrenadante fue recuperado tras 2 horas de migración y analizado mediante citometría de flujo.

## 12 Análisis estadístico

La estadística se realizó empleando el *software* SPSS. Para valorar la distribución normal de los datos, se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov.

En la población de sujetos asintomáticos, las variables continuas se expresan con los valores de las medianas. Las variables categóricas se indicaron como porcentajes. La asociación univariante fue comprobada mediante test de correlación de Pearson. El análisis de regresión lineal multivariante se realizó empleando el IMT carotídeo o la concentración de Gal-3 como variables dependientes, y se incluyeron los factores de riesgo tradicionales y aquellas variables que resultaron significativas en el análisis univariante.

En los pacientes de aterosclerosis carotídea, los valores de Gal-3 se expresaron como las medianas, y fueron analizados mediante test de Mann-Whitney. El análisis de regresión logística ajustado por los factores de riesgo se realizó con la presencia de aterosclerosis como la variable dependiente. Se realizó una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para discriminar los pacientes de aterosclerosis carotídea de los sujetos control.

En el grupo de pacientes de PAD, las variables continuas se presentaron como los valores de las medianas, y las variables categóricas se indicaron como porcentajes. Los sujetos fueron divididos en dos grupos en base a las medianas. Las asociaciones entre variables y los niveles de Gal-3 o la muerte con valores de  $P < 0,01$  fueron consideradas potenciales factores de confusión y fueron ajustadas en los análisis de supervivencia. Para evaluar la asociación entre Gal-3 y la mortalidad cardiovascular se realizó un análisis de regresión de riesgo proporcional de Cox, que fue ajustado por edad, sexo, tabaquismo, DM, ABI, HTN, e infarto agudo de miocardio o evento cerebral isquémico previos. Se calcularon intervalos de confianza del 95% para cada comparación.

Para el análisis de Gal-3 en los pacientes de AAA y sus respectivos controles, se realizó mediante t-Student no pareada. Para valorar la asociación entre Gal-3 y la presencia del AAA, se realizó un análisis de regresión logística multivariante que fue ajustado a los potenciales factores de confusión identificados, que fueron definidos por una probabilidad de asociación mayor al 90% con el tiempo transcurrido hasta la cirugía. Estos factores fueron sometidos a un análisis de regresión de Cox para evaluar la asociación entre el tiempo transcurrido hasta la necesidad de ser intervenido quirúrgicamente y las concentraciones de Gal-3 por encima o debajo de la mediana.

Para el análisis de los modelos animales, se empleó el test de Mann-Whitney, y los resultados se expresan como  $\text{media} \pm \text{SEM}$  (error estadístico medio).

Para el análisis de los experimentos *in vitro*, los experimentos fueron realizados al menos por triplicado, y los resultados se expresan como  $\text{media} \pm \text{SEM}$ . El análisis se realizó mediante t-Student (2 colas, diferencias significativas con  $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

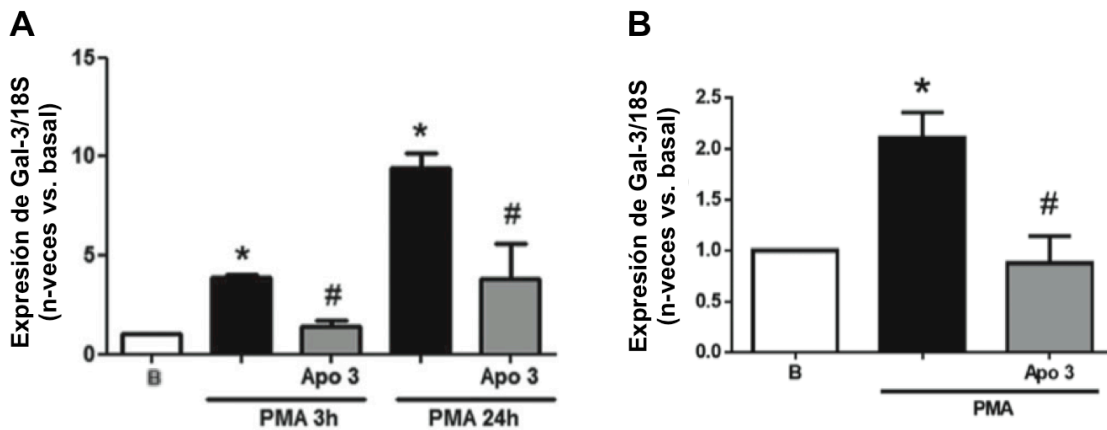
---



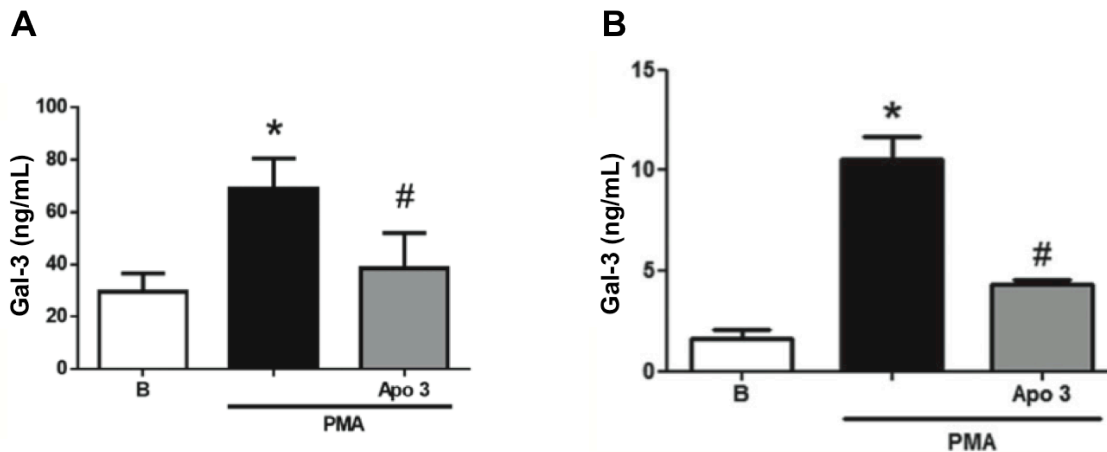
Galectina-3 es una proteína implicada en la regulación de la inflamación a través de diferentes procesos del remodelado vascular patológico. Su papel como biomarcador ha sido testado en HF, y posee características que lo convierten en un potencial biomarcador de aterotrombosis. A nivel terapéutico, la inhibición de galectina-3 ha sido satisfactoria en aterosclerosis experimental, y actualmente se está desarrollando en humanos un ensayo clínico con MCP, el inhibidor farmacológico que hemos seleccionado para nuestro modelo experimental de AAA.

### **1 Gal-3 se expresa en monocitos humanos y es liberada mediante exosomas en condiciones de estrés oxidativo**

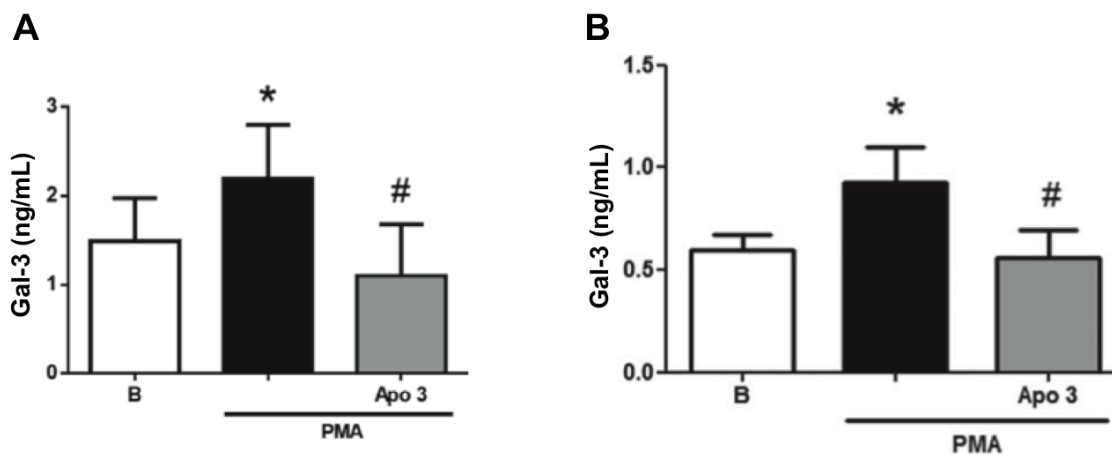
Para estudiar la regulación de Gal-3 en monocitos, hemos analizado el efecto del PMA, un conocido inductor de la actividad NADPH oxidasa, sobre la expresión y liberación de Gal-3 en monocitos de la línea celular THP-1 y en monocitos humanos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica obtenidos de voluntarios sanos. Se ha descrito que el PMA induce la producción de anión superóxido dependiente de la actividad NADPH oxidasa a los 30 minutos(169). En nuestros experimentos, la expresión del mRNA de Gal-3 se incrementó tanto en THP-1 a 3 y 24 horas como en monocitos CD14<sup>+</sup> a 24 horas (**Figura 11**). Además, los niveles extracelulares de Gal-3 a 24 horas se encontraron incrementados tanto en los medios condicionados de los monocitos estimulados con PMA (**Figura 12**) como en los exosomas obtenidos de esos propios medios (**Figura 13**), y la preincubación con apocinina (un inhibidor de la producción de ROS) revirtió el incremento de expresión y la liberación de Gal-3 en monocitos THP-1 y CD14<sup>+</sup>. Los exosomas fueron caracterizados mediante NTA (**Figura 14A y 14B**). Adicionalmente, los exosomas procedentes de monocitos THP-1 fueron caracterizados mediante presencia del marcador exosomal TSG101 (**Figura 14C**).



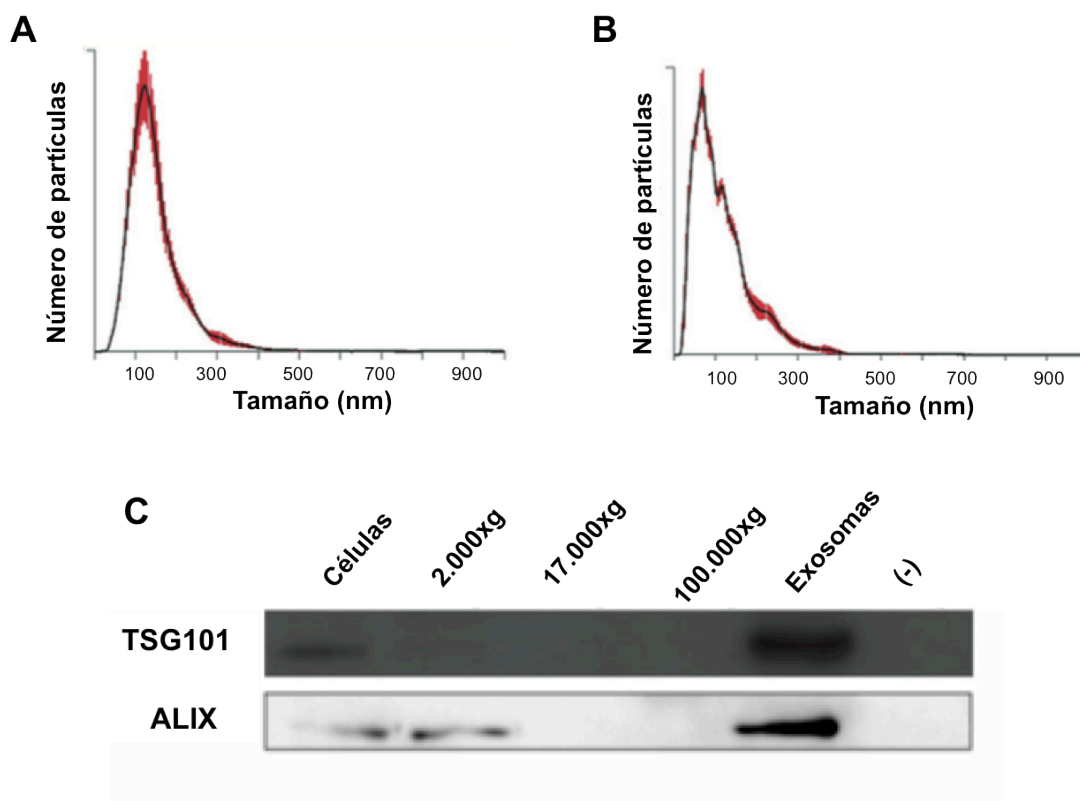
**Figura 11. Expresión de Gal-3 en monocitos.** Cuantificación mediante qPCR de los niveles de mRNA de Gal-3. **A.** Monocitos THP-1 tratados con PMA (3,2mM, 3 y 24 horas) en presencia o ausencia de apocinina (3mM, 30 minutos de preincubación). **B.** Monocitos CD14<sup>+</sup> tratados con PMA (3,2mM, 24 horas) en presencia o ausencia de apocinina (3mM, 30 minutos de preincubación). \*P<0,05 vs. basal; # P<0,05 vs. PMA. B: Basal. PMA: Forbol miristato acetato. Apo3: Apocinina 3mM.



**Figura 12. Secreción de Gal-3 en monocitos.** Cuantificación de Gal-3 mediante ELISA en los sobrenadantes de monocitos THP-1 (**A**) y CD14<sup>+</sup> (**B**) cultivados durante 24 horas. \*P<0,05 vs. basal; # P<0,05 vs. PMA. B: Basal. PMA: Forbol miristato acetato. Apo3: Apocinina 3mM.



**Figura 13. Gal-3 en exosomas derivados de monocitos.** Cuantificación mediante ELISA de Gal-3 en exosomas aislados a partir de los sobrenadantes de monocitos THP-1 (**A**) y CD14<sup>+</sup> (**B**) cultivados durante 24 horas. \*P<0,05 vs. basal; # P<0,05 vs. PMA. B: Basal. PMA: Forbol miristato acetato. Apo3: Apocinina 3mM.

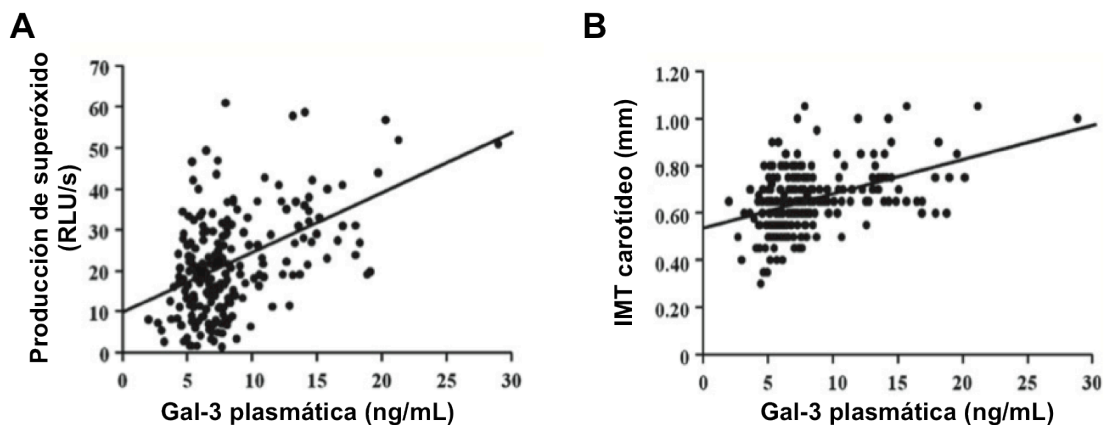


**Figura 14. Caracterización de los exosomas aislados de monocitos.** NTA representativo de exosomas aislados de monocitos THP-1 (A) y CD14<sup>+</sup> de sangre periférica (B). C. Western blot representativo de TSG101 en las distintas fracciones generadas durante el aislamiento de exosomas procedentes de monocitos THP-1. Los distintos carriles muestran un extracto de células y concentrados de los sobrenadantes sometidos a centrifugaciones seriadas. El último carril, marcado como 100.000xg (-) representa la segunda ultracentrifugación a 100.000xg para lavar el pellet de exosomas y descartar proteínas contaminantes. El pellet de exosomas fue resuspendido en tampón de lisis para su análisis por western blot.

## 2 Los niveles plasmáticos de Gal-3 se correlacionan con la etiología de la aterosclerosis en sujetos asintomáticos

Hemos analizado las concentraciones plasmáticas de Gal-3 en una población de 199 sujetos asintomáticos en los que también se midió la actividad NADPH de sus PBMC y el IMT. Gal-3 se correlacionó positivamente con la producción de anión superóxido derivada de la actividad NAD(P)H oxidasa fagocítica (Figura 15A). Esta correlación se mantuvo muy significativa tras el ajuste por edad y sexo (Tabla 9). En un análisis multivariante, la asociación entre los niveles de Gal-3 y la

producción de superóxido derivada de la actividad NADPH oxidasa fagocítica se mantuvo estadísticamente significativa tras el ajuste de algunos factores que podrían estar regulando los niveles de Gal-3 (**Tabla 10**). También se observó una correlación positiva entre Gal-3 y el IMT carotídeo (**Figura 15B**), que se mantuvo significativa después de ajustar por edad y sexo (**Tabla 9**). No se observó correlación alguna entre Gal-3 y otros parámetros clínicos (**Tabla 9**). En un análisis multivariante, la asociación entre los niveles plasmáticos y el IMT carotídeo se mantuvo significativa después del ajuste por potenciales factores de confusión para el riesgo de ECV (**Tabla 11**). Por otra parte, se observaron niveles incrementados de gal-3 en sujetos asintomáticos con placas carotídeas en comparación con sujetos sin placa (8,05 [7,05–12,1] frente a 6,70 [5,36–8,17] ng/mL,  $P < 0,001$ ).



**Figura 15. Niveles plasmáticos de Gal-3 en sujetos asintomáticos. A.** Correlación entre los niveles plasmáticos de Gal-3 y la producción de superóxido dependiente de la NAD(P)H oxidasa ( $n=199$ ;  $r=0,450$ ;  $p < 0,001$ ). **B.** Correlación entre los niveles plasmáticos de Gal-3 y el IMT carotídeo en sujetos asintomáticos ( $n=199$ ;  $r=0,438$ ;  $P < 0,001$ ). RLU/s: unidades de luz relativas/segundo.



CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	IMT CAROTÍDEO		GALECTINA-3	
	r	P	r	P
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0,097	0,187	0,022	0,762
SBP (mm Hg)	0,188	0,010	-0,013	0,859
DBP (mm Hg)	0,129	0,081	-0,036	0,627
Glucosa (mg/dL)	0,245	0,001	0,130	0,078
Colesterol Total (mg/dL)	0,032	0,665	-0,103	0,161
Colesterol HDL (mg/dL)	-0,125	0,089	-0,011	0,883
Colesterol LDL (mg/dL)	0,054	0,466	-0,032	0,094
Triglicéridos (mg/dL)	0,113	0,125	0,147	0,079
hs-CRP (mg/dL)	0,072	0,378	0,103	0,210
Creatinina sérica (mg/dL)	-0,034	0,647	0,059	0,422
Tasa de filtración glomerular (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	-0,018	0,809	-0,088	0,231
Galectina (mg/dL)	0,376	<0,001	-----	-----
IMT carotídeo (mm)	-----	-----	0,376	<0,001
Producción de superóxido (RLU/s)	0,630	<0,001	0,450	<0,001

Tabla 9. Coeficientes de correlación del IMT carotídeo medio y Gal-3 con parámetros clínicos y de laboratorio en el grupo de sujetos asintomáticos (n=199) ajustado por edad y sexo. Correlaciones y significaciones del coeficiente de correlación de Pearson. RLU/s: unidades de luz relativas/segundo.

VARIABLE INDEPENDIENTE	$\beta$	P	R <sup>2</sup> PARCIAL(%)
Producción de superóxido (RLU/s)	0,163	<0,001	21,3
Edad (años)	0,043	0,044	3,1
Sexo (masculino/ femenino)	-0,276	0,693	0,0
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	0,087	0,193	0,2
Hipertensión (no/sí)	-1,085	0,077	1,2
Fumador (no/sí)	-0,663	0,578	0,1
Glucosa (mg/dL)	-0,008	0,472	0,2

Tabla 10. Análisis de regresión lineal múltiple con los niveles de Gal-3 como variable dependiente en el grupo de sujetos asintomáticos (n=199).  $\beta$ : coeficiente de regresión. R<sup>2</sup> para la población total fue 26,1%. R<sup>2</sup>: coeficiente de correlación parcial tras el ajuste. RLU/s: unidades de luz relativas/segundo.

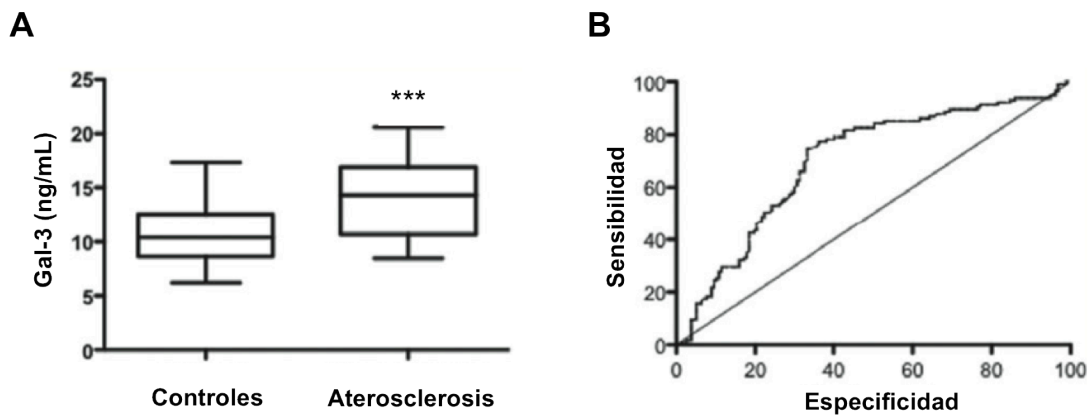
VARIABLE INDEPENDIENTE	$\beta$	P	R <sup>2</sup> PARCIAL(%)
------------------------	---------	---	---------------------------

Galectina-3 (ng/mL)	0,013	<0,001	19,0
Edad (años)	0,002	0,020	7,0
Sexo (masculino/ femenino)	0,035	0,104	1,2
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	0,001	0,836	0,9
Hipertensión (no/sí)	0,063	0,001	4,0
Fumador (no/sí)	0,036	0,294	0,3
Colesterol total (mg/dL)	0,001	0,278	0,4
Glucosa (mg/dL)	0,001	0,036	1,8

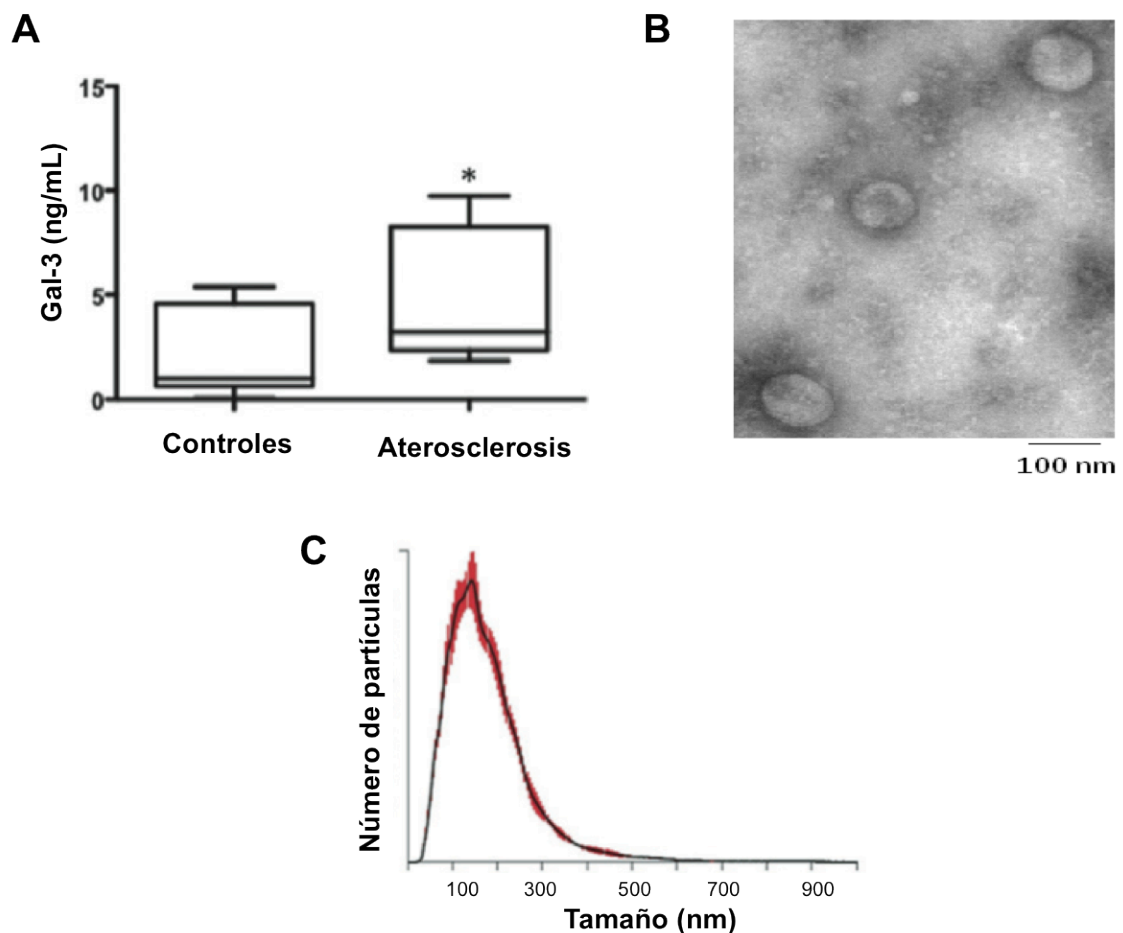
Tabla 11. Análisis de regresión lineal múltiple con el IMT carotídeo como variable dependiente en el grupo de sujetos asintomáticos (n=199). R<sup>2</sup> para la población total fue 34,6%. R<sup>2</sup>: coeficiente de correlación parcial tras el ajuste.  $\beta$ : coeficiente de regresión.

### **3 Los niveles plasmáticos de Gal-3 se encuentran incrementados en pacientes con aterosclerosis carotídea**

Hemos analizado los niveles plasmáticos de gal-3 en una población de 158 pacientes con aterosclerosis carotídea y 115 controles. Los niveles en los sujetos con aterosclerosis carotídea resultaron superiores a los de los controles (**Figura 16A**). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en CRP (2,3 [1,1–5,2] frente a 1,7 [0,9–3,5]). Un análisis de regresión logística mostró que la asociación entre los niveles de gal-3 y la aterosclerosis se mantiene significativa tras el ajuste por factores de riesgo (**Tabla 12**). Los análisis de curva ROC mostraron que los niveles de gal-3 son predictores de la presencia de aterosclerosis carotídea (**Figura 16B**). Además, la concentración de gal-3 en exosomas aislados de plasmas de 10 pacientes con aterosclerosis carotídea resultó mayor que la de los exosomas aislados de 10 controles (**Figura 17A**). Los exosomas aislados a partir de plasma fueron caracterizados mediante NTA y microscopía electrónica (**Figura 17B y 17C**).



**Figura 16. Niveles plasmáticos de Gal-3 en pacientes con aterosclerosis carotídea. A.** Concentraciones plasmáticas de Gal-3 en pacientes con aterosclerosis carotídea (n=158) y controles (n=115) **B.** Curva ROC para discriminar la población de pacientes (n=158) de los controles (n=115) [AUC [95% CI]=0,7 [0,64-0,76]; P<0,001]. \*\*\*P<0,001. AUC: Área bajo la curva.



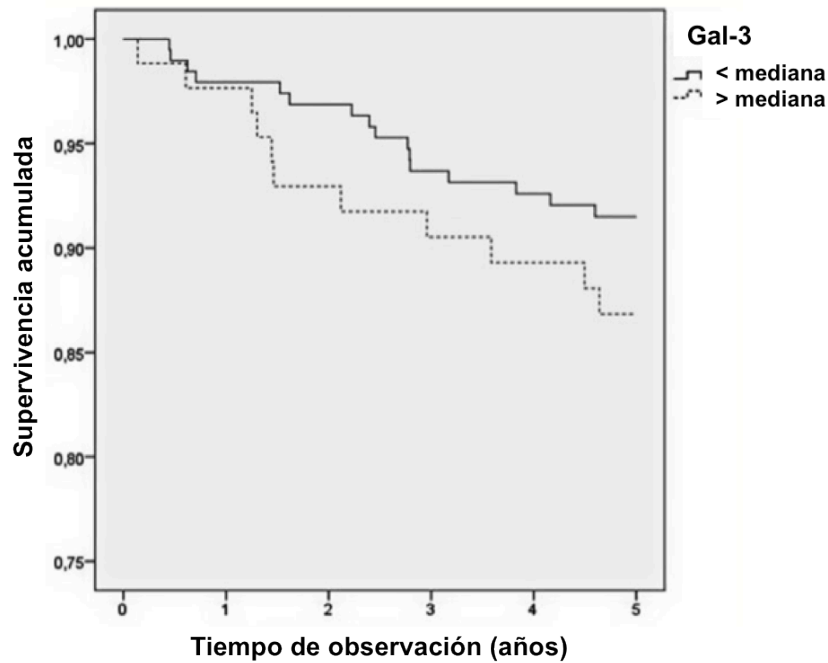
**Figura 17. Gal-3 en exomas aislados de plasmas de pacientes con aterosclerosis carotídea y controles (n=10). A.** Concentraciones plasmáticas de gal-3 cuantificadas mediante ELISA. **B.** Fotografía de microscopía electrónica con exomas aislados de plasma humano. Se muestra barra de escala de 100nm. **C.** NTA representativo de exomas aislados de plasma humano. \*P<0,05.

	B	SE	Sig	Exp (B)
<b>Constante</b>	12,271	18,375	0,504	213.405,4
<b>Sexo</b>	-8,777	18,226	0,630	0,000
<b>Edad</b>	-0,089	0,029	0,002	0,915
<b>Fumador actual</b>	-0,219	0,332	0,509	0,803
<b>HTA</b>	1,137	0,345	0,001	3,119
<b>DM</b>	0,731	0,401	0,068	2,078
<b>Dislipemia</b>	0,942	0,342	0,006	2,565
<b>Galectina-3</b>	-0,115	0,032	0,000	0,892

Tabla 12. Análisis de regresión logística con la aterosclerosis como variable dependiente (158 pacientes de aterosclerosis vs. 115 controles).

#### **4 Los niveles circulantes de Gal-3 en pacientes con PAD se asocian al riesgo de mortalidad cardiovascular**

Hemos examinado las concentraciones séricas de Gal-3 en una población de pacientes con PAD (n=309) con un seguimiento de 5 años. Las concentraciones de Gal-3 superiores a la mediana se asociaron significativamente con un incremento del 80% en el riesgo total de mortalidad en comparación con las concentraciones de Gal-3 inferiores a la mediana. Este incremento aumentó hasta el 97% tras el ajuste por los potenciales factores de confusión. Además, los niveles de Gal-3 superiores a la mediana se asociaron significativamente con el riesgo de muerte cardiovascular en comparación con los niveles inferiores a la mediana, incrementándose hasta el 124% tras el ajuste por los potenciales factores de confusión (**Figura 18**). En este análisis multivariante, el infarto de miocardio previo, la presencia de angina de pecho y la CRP incrementaron de forma independiente el riesgo de muerte cardiovascular durante los siguientes 5 años (**Tabla 13**).



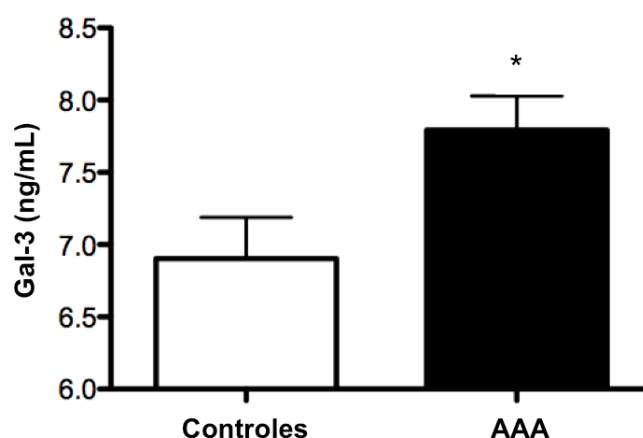
**Figura 18. La concentración sérica de Gal-3 predice la mortalidad en pacientes con PAD.** Curva Kaplan-Meier para la mortalidad cardiovascular acorde a niveles por encima o debajo de la mediana de la concentración de Gal-3 en suero en pacientes con PAD sintomática (n=309)(riesgo relativo ajustado [HR]=2,24; 95% CI; 1,06-4,73; P<0,05).

	B	SE	P	HR AJUSTADO	95% CI PARA HR AJUSTADO	
					INFERIOR	SUPERIOR
<b>Galectina-3</b>	0,808	0,381	0,034	2,243	1,063	4,735
<b>Sexo</b>	0,473	0,382	0,215	1,604	0,759	3,389
<b>Edad</b>	0,037	0,023	0,113	1,037	0,991	1,086
<b>Fumador actual</b>	-0,519	0,392	0,185	0,595	0,276	1,282
<b>DM</b>	0,306	0,246	0,213	1,358	0,839	2,198
<b>Mínima presión arterial tobillo-brazo</b>	-1,871	1,055	0,076	0,154	0,019	1,217
<b>AAA</b>	-0,429	0,795	0,590	0,651	0,137	3,096
<b>Infarto agudo de miocardio</b>	0,977	0,395	0,013	2,656	1,226	5,756
<b>Evento cerebrovascular</b>	0,613	0,492	0,213	1,846	0,704	4,840
<b>Angina de pecho</b>	1,116	0,382	0,003	3,053	1,445	6,452
<b>Hipertensión</b>	0,109	0,409	0,789	1,116	0,500	2,487
<b>hs-CRP</b>	0,013	0,005	0,016	1,013	1,002	1,023

**Tabla 13. Análisis de regresión multifactorial de Cox de la mediana de Gal-3 en el pronóstico de la muerte cardiovascular a 5 años.**  $\beta$ : coeficiente de regresión. HR: riesgo relativo.

## 5 Los niveles circulantes de Gal-3 en pacientes con AAA se asocian a la presencia y a la progresión de la enfermedad

Hemos estudiado las concentraciones séricas de Gal-3 en una cohorte danesa con seguimiento durante 5 años (n=225) y el grupo control correspondiente (n=100). El incremento en los niveles de Gal-3 en el grupo de AAA en comparación al grupo control resultó significativo (**Figura 19**). El análisis de regresión logística mostró que la asociación persistió después del ajuste por diversos factores (**Tabla 14**). En aquellos AAA en seguimiento, las concentraciones de Gal-3 superiores a la mediana se asociaron significativamente con una mayor tasa de intervención quirúrgica (relacionada con el crecimiento del AAA por encima de los 5cm de diámetro) en comparación con las concentraciones de Gal-3 inferiores a la mediana (**Figura 20**). Además, el análisis de regresión de Cox para la asociación de los niveles circulantes de Gal-3 y la necesidad de ser intervenido quirúrgicamente debido al crecimiento del AAA mostró un incremento significativo del riesgo que resultó independiente de diversos factores de confusión (**Tabla 15**).



**Figura 19. La concentración sérica de Gal-3 en pacientes con AAA refleja la presencia de la enfermedad. A.** Concentraciones séricas de Gal-3 en una cohorte danesa de pacientes de AAA (n=228). \*P<0,05 vs. sanos.

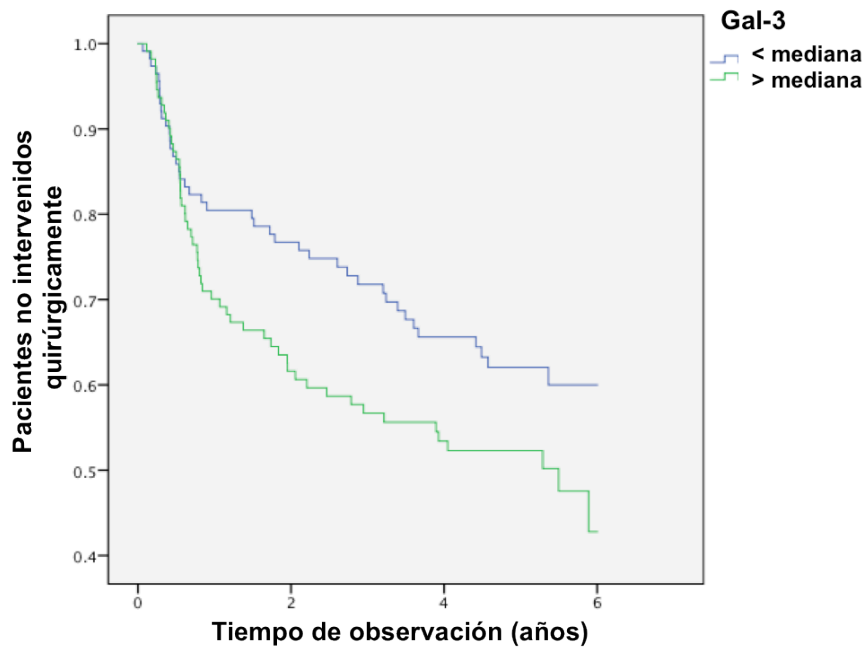
	B	SE	P	OR	95% CI PARA OR	
					INFERIOR	SUPERIOR
<b>Galectina-3</b>	0,139	0,063	0,028	1,150	1,015	1,301
<b>Predisposición familiar</b>	1,009	0,920	0,273	2,743	0,452	16,635
<b>Fumador actual</b>	1,240	0,437	0,005	3,455	1,468	8,130
<b>DM</b>	-0,614	0,572	0,283	0,541	0,176	1,660
<b>HTA</b>	-0,412	0,389	0,289	0,662	0,309	1,419
<b>BMI</b>	0,097	0,058	0,095	1,101	0,983	1,234
<b>Uso de inhibidores ECA</b>	0,834	0,511	0,102	2,302	0,846	6,263
<b>Uso de <math>\beta</math>-bloqueantes</b>	0,195	0,446	0,662	1,215	0,507	2,909
<b>Uso de <math>\beta</math>-agonistas</b>	0,402	0,656	0,540	1,495	0,413	5,414
<b>Uso de estatinas</b>	0,458	0,438	0,295	1,581	0,671	3,729
<b>Uso de antiagregantes</b>	1,690	0,437	0,000	5,418	2,302	12,755
<b>DBP (mm Hg)</b>	0,128	0,021	0,000	1,136	1,091	1,184
<b>PAD</b>	3,413	1,102	0,002	30,357	3,500	263,285
<b>hs-CRP</b>	-0,002	0,024	0,920	0,998	0,953	1,045
<b>Constante</b>	-14,824	2,485	0,000	0,000		

Tabla 14. Análisis de regresión logística con Gal-3 como factor de riesgo independiente de la presencia de AAA.

	B	SE	P	HR	95% CI PARA HR	
					INFERIOR	SUPERIOR
<b>Galectina-3</b>	0,604	0,248	0,015	1,829	1,126	2,972
<b>Predisposición familiar</b>	0,313	0,540	0,562	1,368	0,475	3,941
<b>Fumador actual</b>	-0,634	0,260	0,015	0,530	0,319	0,882
<b>DM</b>	0,415	0,366	0,257	1,514	0,739	3,105
<b>HTA</b>	0,152	0,270	0,573	1,164	0,686	1,974
<b>BMI</b>	-0,073	0,037	0,046	0,930	0,865	0,999
<b>Uso de inhibidores ECA</b>	-0,053	0,304	0,862	0,949	0,523	1,721
<b>Uso de <math>\beta</math>-bloqueantes</b>	-0,302	0,298	0,311	0,740	0,413	1,326
<b>Uso de <math>\beta</math>-agonistas</b>	-0,015	0,446	0,973	0,985	0,411	2,359
<b>Uso de estatinas</b>	0,101	0,270	0,709	1,106	0,652	1,877
<b>Uso de antiagregantes</b>	-0,221	0,283	0,434	0,802	0,461	1,395
<b>DBP (mm Hg)</b>	0,018	0,010	0,085	1,018	0,998	1,039
<b>PAD</b>	-0,143	0,313	0,647	0,867	0,470	1,599
<b>hs-CRP</b>	-0,012	0,014	0,396	0,988	0,962	1,016
<b>Máximo tamaño aórtico</b>	0,101	0,009	0,000	1,106	1,087	1,125

**Tabla 15. Análisis de regresión de Cox para la necesidad de ser intervenido quirúrgicamente en la población de AAA.**

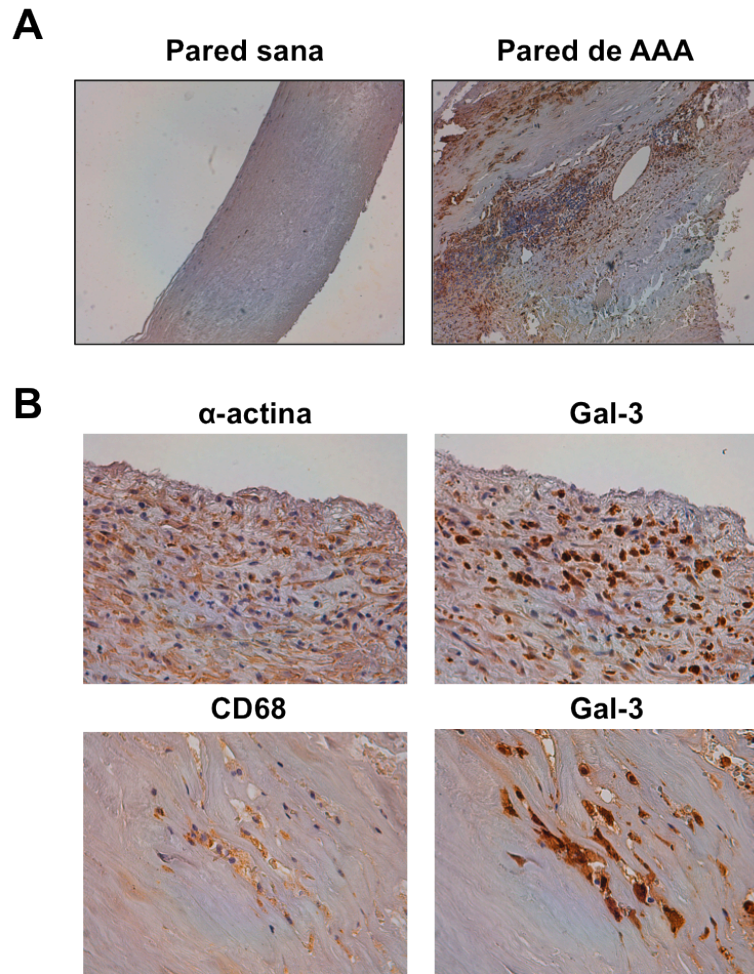




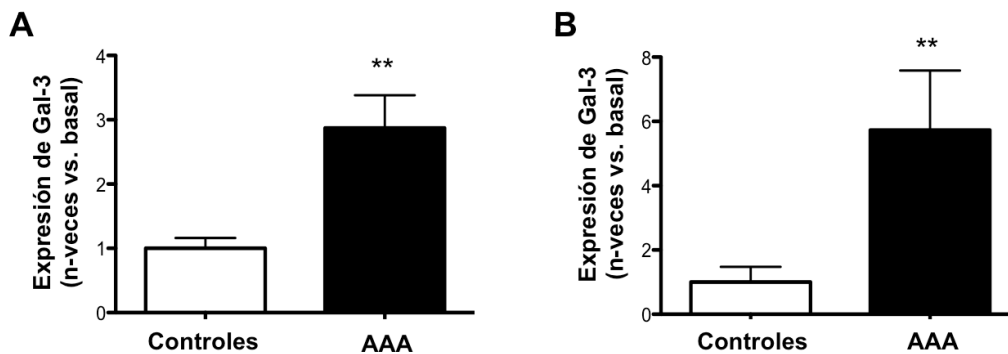
**Figura 20.** La concentración sérica de Gal-3 en pacientes de AAA refleja la progresión de la enfermedad. Curva Kaplan-Meier para intervención quirúrgica acorde a niveles por encima o debajo de la mediana de la concentración de Gal-3 en suero en pacientes con AAA (n=225).

## **6 Los macrófagos y CMLV de la pared patológica de AAA expresan Gal-3**

Hemos examinado la presencia de Gal-3 en la pared patológica de AAA y en tejido sano humano. La inmunohistoquímica reveló la presencia mayoritaria de Gal-3 en el tejido patológico (**Figura 21A**). Además, la presencia de Gal-3 colocalizó en cortes seriados con CD68 y  $\alpha$ -actina, marcadores de células fagocíticas y CMLV respectivamente (**Figura 21B**). A nivel transcripcional, hemos encontrado un aumento significativo de la expresión de Gal-3 en la pared patológica respecto a la pared sana (**Figura 22A**). En el AAA experimental murino, también hemos observado un incremento significativo de la expresión de Gal-3 en las aortas de ratones perfundidos con elastasa en comparación con las de ratones sanos (**Figura 22B**).



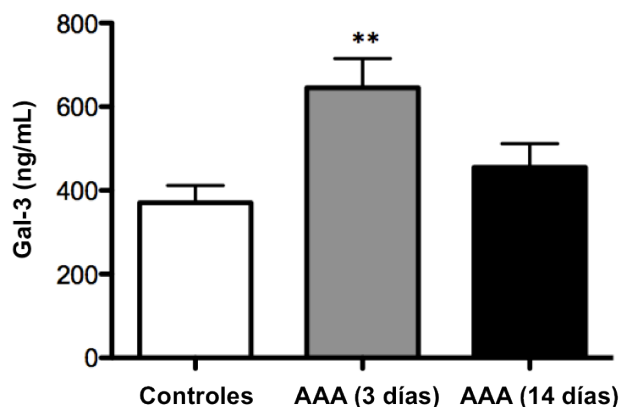
**Figura 21. Localización de gal-3 en la pared vascular de AAA.** A. Inmunohistoquímica representativa de Gal-3 en pared vascular patológica de AAA y sana. B. Colocalizaciones de Gal-3 con CD68 (células fagocíticas) y  $\alpha$ -actina (CMLV) en cortes seriados de pared patológica de AAA.



**Figura 22. Expresión de Gal-3 en AAA humano y experimental.** A. Cuantificación mediante qPCR de la expresión de Gal-3 en pared vascular patológica de pacientes con AAA (n=9) y pared sana (n=9). B. Cuantificación mediante qPCR de la expresión de Gal-3 en aortas murinas sanas (n=9) y en AAA experimentales murinos generados mediante perfusión de elastasa (n=6). \*\*P<0,01 vs. controles.

## **7 Los niveles circulantes de Gal-3 aumentan tras la inducción del AAA por elastasa**

Hemos analizado los niveles de Gal-3 en suero y tejido de ratones a los que se les indujo AAA experimental por elastasa. Los niveles séricos de Gal-3 se encontraron incrementados significativamente tras tres días de la perfusión con elastasa en comparación con ratones sanos (**Figura 23**,  $p < 0,01$ ). Tras 14 días de la perfusión con elastasa no encontramos diferencias en las concentraciones séricas de Gal-3 entre ratones con AAA y ratones sanos.

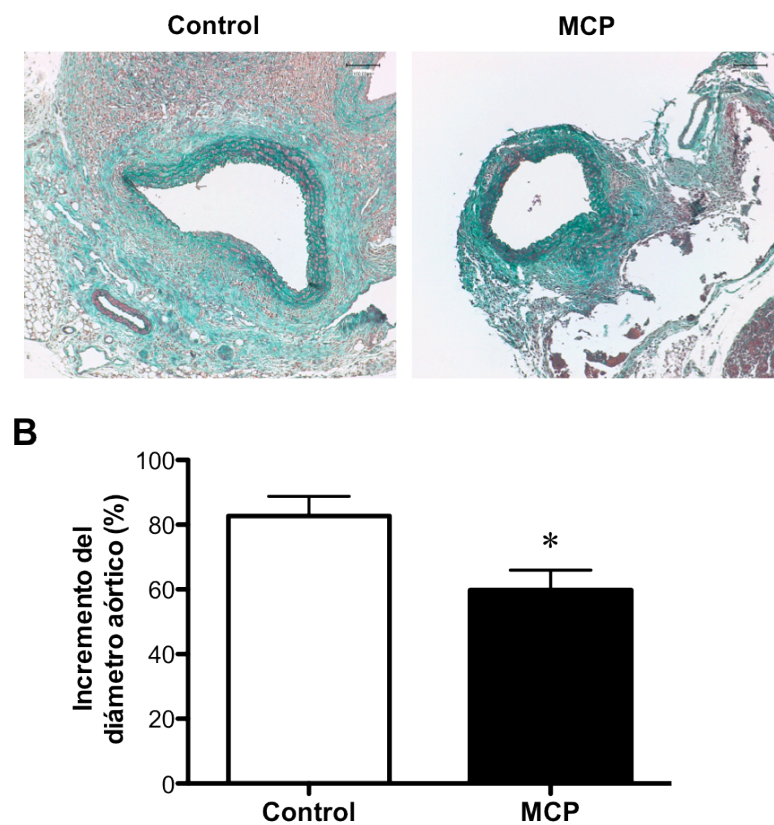


**Figura 23. Concentraciones séricas de Gal-3 en AAA experimentales murinos.** A día 3,  $n=6$  y a día 14,  $n=14$ ; controles  $n=12$ . \*\* $P < 0,01$  vs. controles.

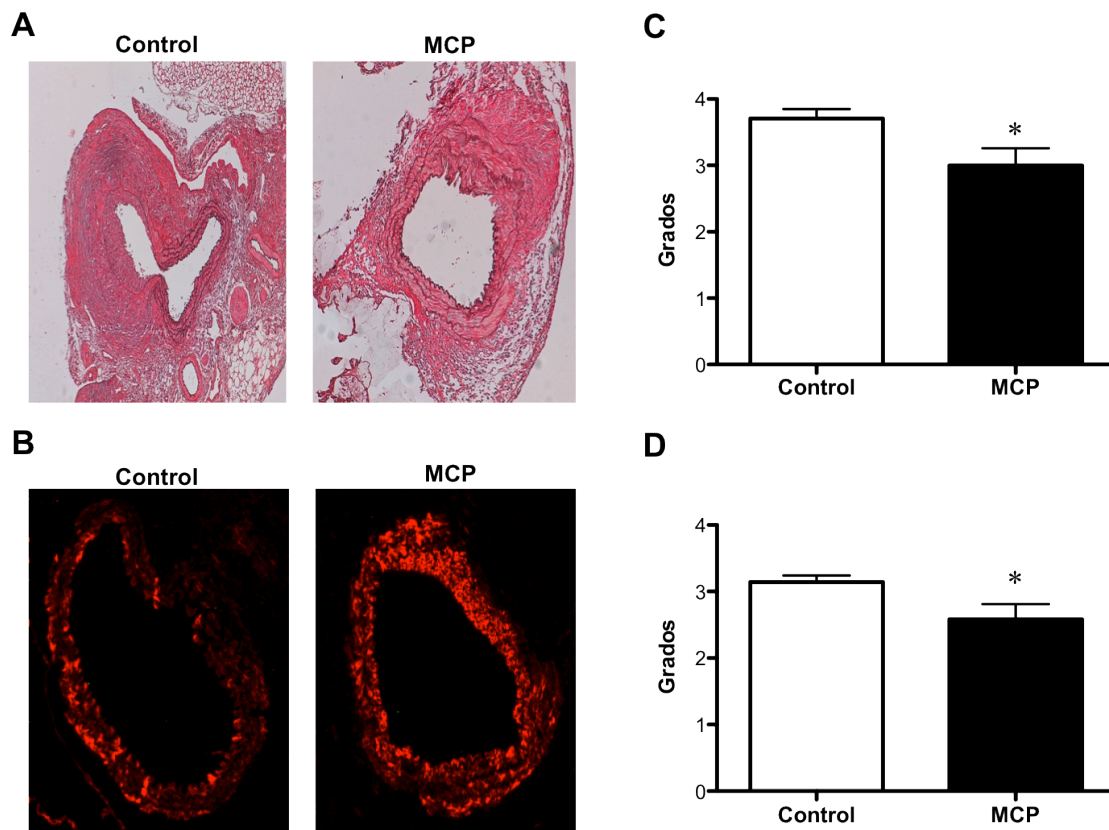
## **8 El tratamiento con *modified citrus pectin* (MCP) disminuye la progresión del AAA inducido por elastasa**

Para investigar el potencial beneficio de inhibir Gal-3 para evitar el desarrollo de AAA, hemos empleado MCP, un inhibidor farmacológico de Gal-3 que fue administrado a los ratones por vía intravenosa a días alternos, en una dosis de 10mg/kg y desde un día antes de la cirugía experimental. Tras 14 días de la perfusión con elastasa, el incremento del diámetro aórtico resultó

significativamente menor en los ratones tratados con MCP con respecto a ratones controles que recibieron inyecciones de suero salino (**Figura 24**). Además, el grupo tratado con MCP mostró una mayor conservación de las capas de elastina, observada mediante tinción de Verhoeff van Gieson (**Figura 25A y 25C**). Asimismo, la inmunohistoquímica de  $\alpha$ -actina reveló una reducción en la pérdida de CMLV en comparación con el grupo control (**Figura 25B y 25D**).



**Figura 24. El tratamiento con MCP reduce el incremento del diámetro aórtico en el AAA experimental. A.** Tinción representativa de tricrómico de Masson. **B.** Incremento del diámetro aórtico en ratones tratados con suero salino (control, n=17) o MCP (n=14) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. controles.

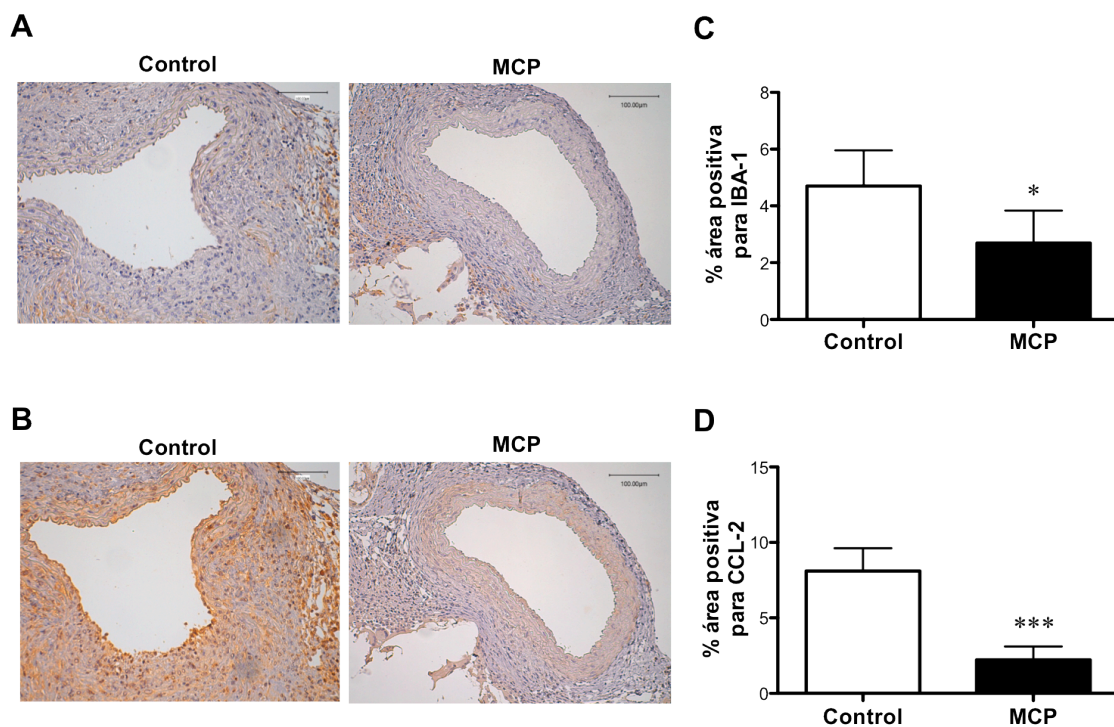


**Figura 25. El tratamiento con MCP favorece la estabilidad de la capa media en el AAA experimental. A.** Tinción representativa de Verhoeff van Gieson. **B.** Inmunofluorescencia representativa de  $\alpha$ -actina. **C y D.** Cuantificación mediante escala de grados de la conservación de las capas de elastina y de las CMLV en ratones tratados con suero salino (control, n=17) o MCP (n=14) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. controles.

## **9 El tratamiento con MCP disminuye el infiltrado monocitario y la expresión de CCL-2 en el AAA inducido por elastasa**

Para averiguar si la respuesta inmunoinflamatoria adventicial se encontraba también disminuida a causa del tratamiento con MCP, analizamos la composición celular de la adventicia. No detectamos diferencias significativas en la presencia de neutrófilos entre el grupo tratado con MCP y el control (39,47±38,51 frente a 51,29±63,92 neutrófilos Ly6G<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de lesión), pero sí observamos un descenso

significativo en el infiltrado de macrófagos en el grupo tratado con MCP (**Figura 26A y 26C**). De acuerdo con esta observación, también se produjo un descenso en la presencia de la quimioquina proinflamatoria CCL-2 en la pared vascular de los ratones tratados con MCP respecto a los controles (**Figura 26B y 26D**). Por otra parte, no detectamos diferencias en la inmunotinción de Gal-3 en la pared vascular ( $4,81\pm 6,09\%$  frente a  $3,36\pm 3,35\%$  área Gal-3<sup>+</sup>/área total) ni en las concentraciones séricas ( $573\pm 279$  frente a  $435\pm 213\text{ng/mL}$ ) entre el grupo tratado con MCP y el control.



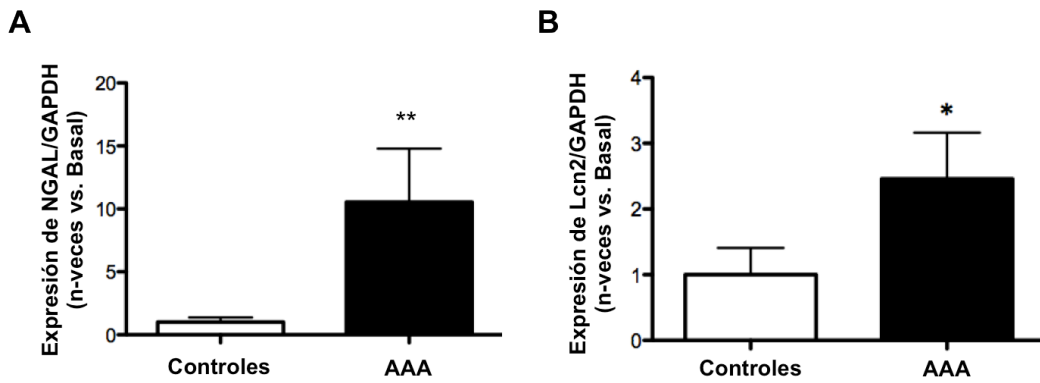
**Figura 26. El tratamiento con MCP disminuye la respuesta inmunoinflamatoria en el AAA experimental.** **A.** Inmunohistoquímica representativa de IBA-1 **B.** Inmunohistoquímica representativa de CCL-2. **C y D.** Cuantificación del área positiva para IBA-1 y CCL-2 en la pared vascular del AAA experimental en ratones tratados con suero salino (control, n=17) o MCP (n=14) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. controles. \*\*\*P<0,001 vs. controles. Barras de escala: 100µm.



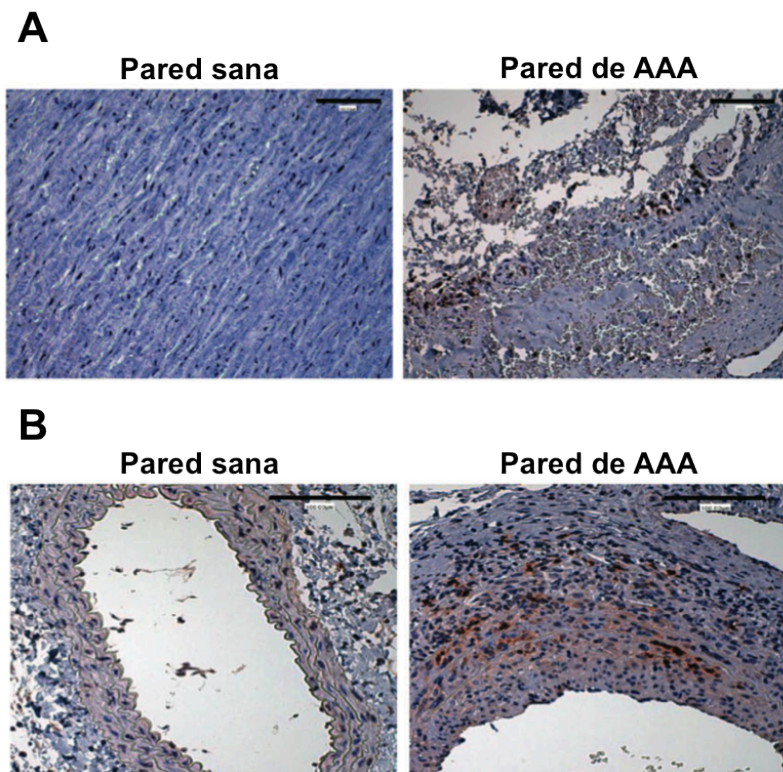
Los trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que NGAL se encuentra aumentado en neutrófilos circulantes y plasmas de pacientes de AAA, pero hasta el momento no hay estudios sobre su papel en esta patología. En este estudio, hemos empleado la deleción génica y la inhibición farmacológica de Lcn2 para estudiar su efecto sobre el AAA experimental inducido por elastasa y valorar su potencial efecto terapéutico.

## **10 NGAL/Lcn2 está sobrexpresado en AAA humano y murino inducido por elastasa**

A pesar de que los estudios previos han documentado la presencia de NGAL en pared y trombo de AAA humano, no se ha determinado si existe una mayor actividad transcripcional de NGAL/Lcn2 en el tejido patológico de AAA respecto al tejido sano. Hemos comparado la expresión de mRNA de NGAL/Lcn2 en paredes patológicas de AAA y en paredes sanas, observando que se encuentra incrementada en la pared patológica, tanto en el AAA humano como en el experimental (**Figura 27**). A nivel de proteína, la inmunohistoquímica proporcionó resultados similares en tejido humano y murino (**Figura 28**). Además, observamos que Lcn2 es expresada por neutrófilos y CMLV en la pared vascular patológica del AAA experimental (**Figura 29**). Los niveles plasmáticos de Lcn2 se encontraron incrementados en el AAA experimental (tanto a 3 como 14 días tras la perfusión con elastasa) en comparación con los ratones sanos (**Figura 30**), de forma similar a lo descrito para AAA humanos en trabajos anteriores del grupo(161).

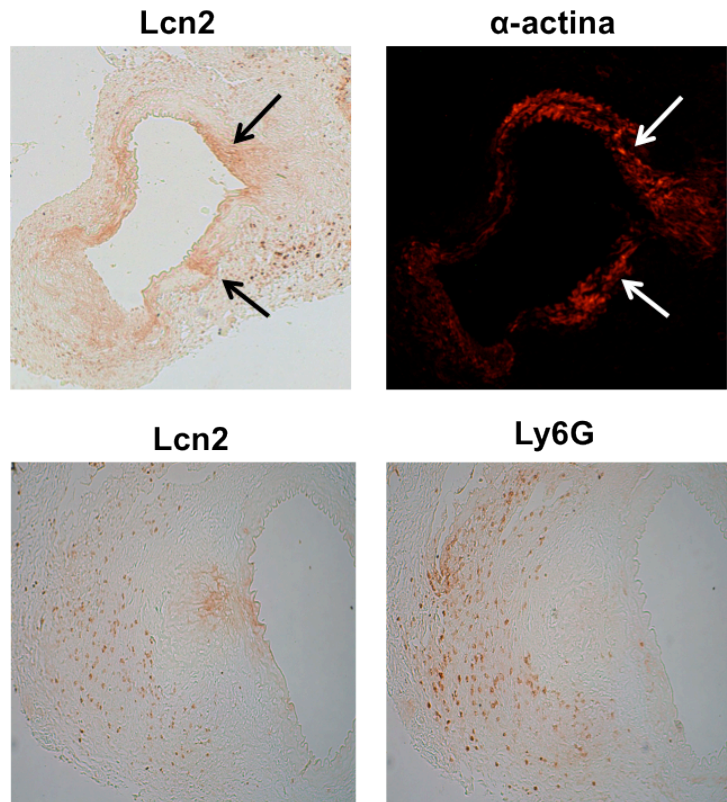


**Figura 27. Expresión de NGAL/Lcn2 en la pared vascular de AAA.** Cuantificación mediante qPCR de la expresión de NGAL/Lcn2 (**A** y **B** respectivamente) en pared vascular de AAA (n=7 y n=6) y pared vascular sana (n=11 y n=9 respectivamente). \*P<0,05 vs. controles. \*\*P<0,01 vs. controles.

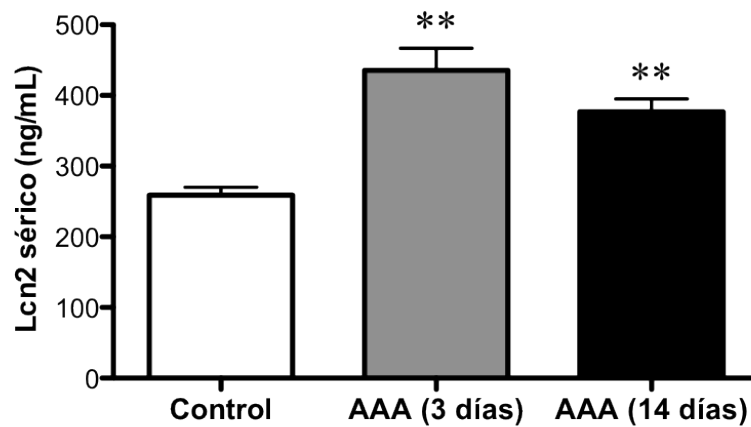


**Figura 28. Expresión de NGAL/Lcn2 en la pared vascular de AAA.** **A.** Inmunohistoquímica representativa de NGAL en pared vascular patológica de paciente con AAA y pared sana. **B.** Inmunohistoquímica representativa de Lcn2 en pared vascular de AAA experimental murino y de controles sanos.





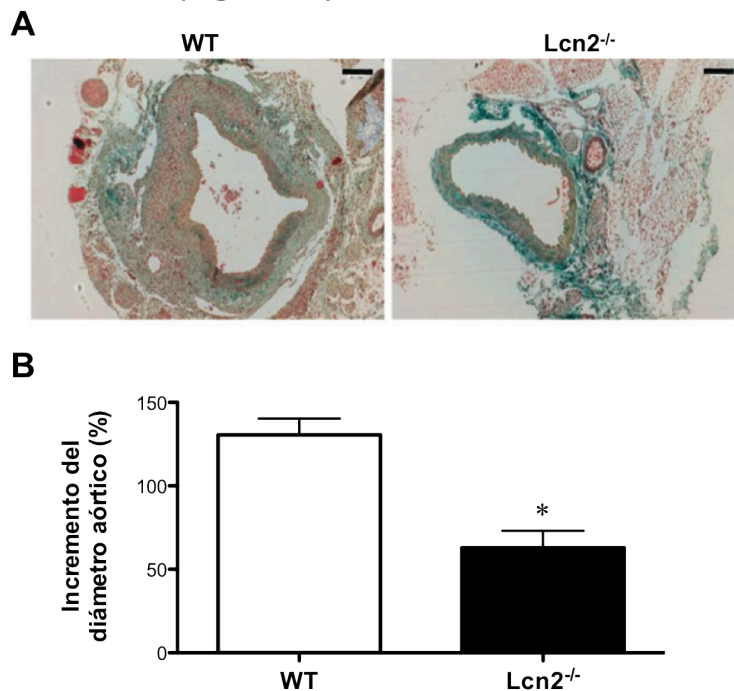
**Figura 29. Colocalización de Lcn2 con macrófagos y CMLV en la pared vascular de AAA.** Inmunofluorescencia de  $\alpha$ -actina (marcador de CMLV, aumento 10X) y Ly6G (neutrófilos, aumento 20X) en cortes seriados. Barras de escala: 100 $\mu$ m.



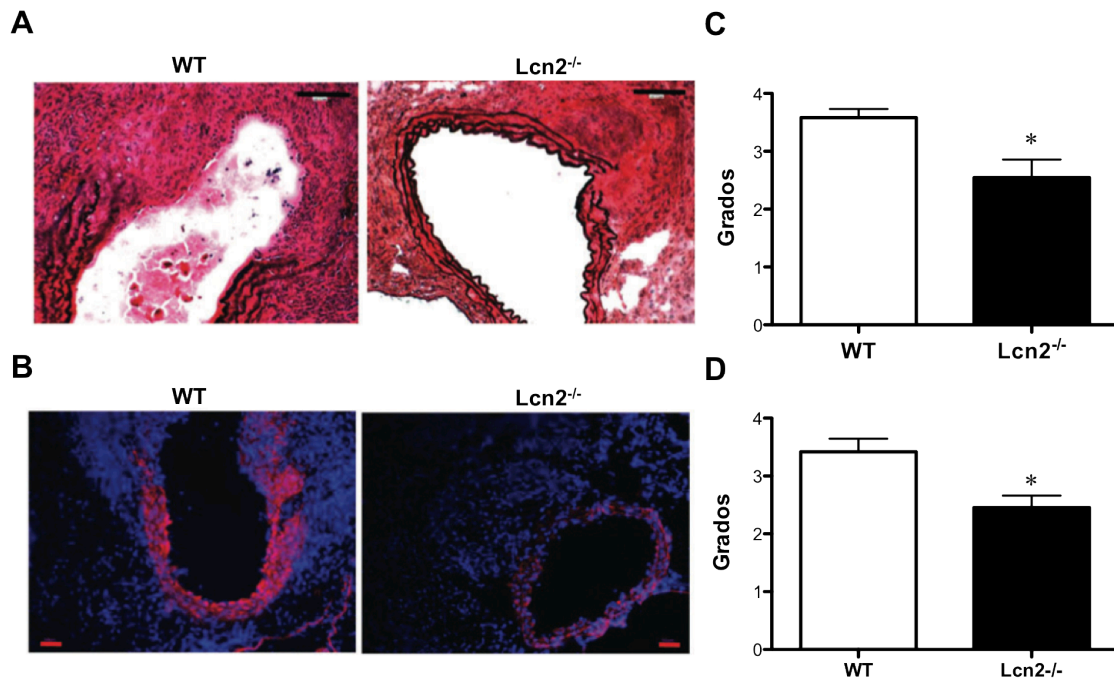
**Figura 30. Concentraciones séricas de Lcn2 en AAA experimentales murinos.** A día 3, n=6 y a día 14, n=14; controles n=12. \*\*P<0,01 vs. controles.

## **11 La deficiencia de Lcn2 disminuye el desarrollo y el crecimiento del AAA inducido por elastasa**

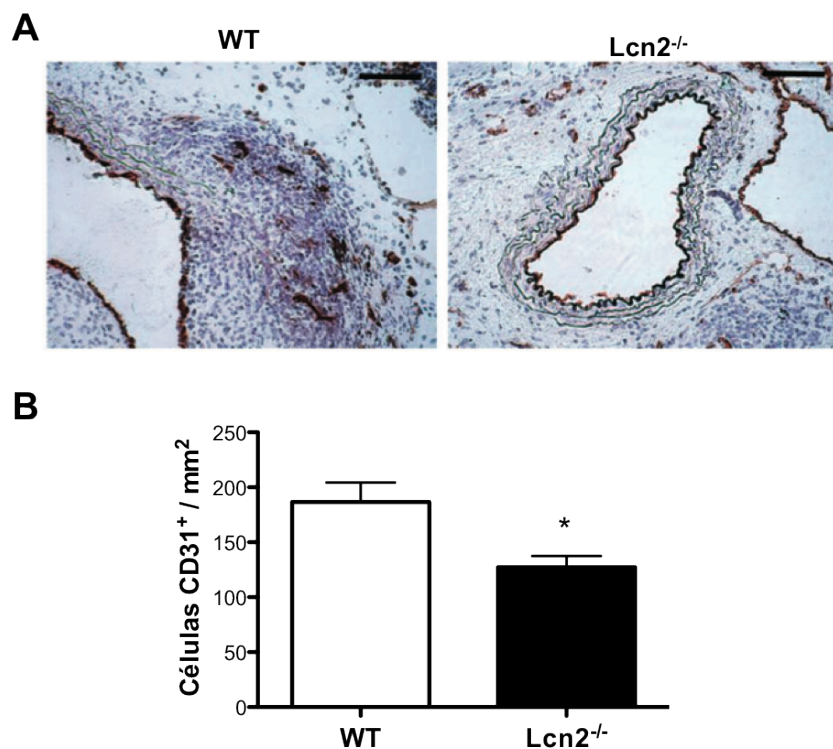
Dado el incremento en la expresión de Lcn2 observado en el aneurisma murino inducido por perfusión con elastasa, realizamos este mismo modelo experimental en ratones Lcn2<sup>-/-</sup> para investigar su función en el AAA. El incremento del diámetro aórtico en los ratones Lcn2<sup>-/-</sup> fue significativamente más bajo que en los ratones WT (**Figura 31**). Entre los ratones *sham* (aquellos operados pero perfundidos con suero salino en lugar de elastasa), ni los Lcn2<sup>-/-</sup> ni los WT desarrollaron AAA, y el leve incremento observado en el diámetro aórtico fue equivalente en ambos grupos (32,7 ± 3,5 en WT frente a 32,5 ± 7,1% en Lcn2<sup>-/-</sup>, P>0,05). Mediante tinción de Verhoeff van Gieson mostramos que la degradación de elastina fue menor en ratones Lcn2<sup>-/-</sup> que en ratones WT tras 14 días de la perfusión con elastasa (**Figura 32A y 32C**). Además, la inmunodetección de  $\alpha$ -actina reveló que la pérdida de CMLV era mayor en ratones WT que en ratones Lcn2<sup>-/-</sup>, que tenían un mayor contenido de CMLV (**Figura 32B y 32D**). Por otra parte, hemos determinado una reducción en el número de neovasos en la adventicia de los ratones Lcn2<sup>-/-</sup> en comparación con los WT (**Figura 33**).



**Figura 31. El incremento del diámetro aórtico es menor en el AAA experimental de ratones Lcn2<sup>-/-</sup>.** A. Tinción representativa de tricrómico de Masson B. Cuantificación del incremento del diámetro aórtico en ratones WT (n=10) y Lcn2<sup>-/-</sup> (n=11) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. WT. Barras de escala: 100 $\mu$ m.



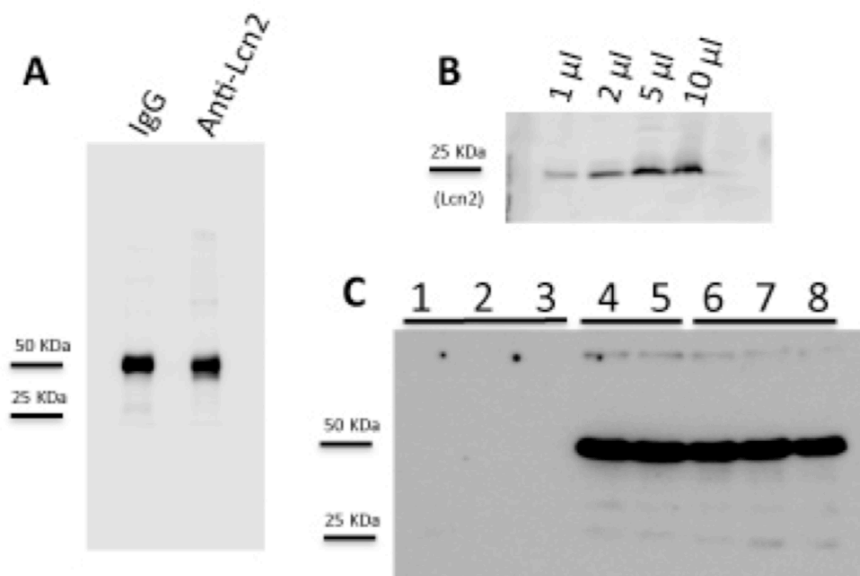
**Figura 32. Mayor conservación de la capa media en el AAA experimental de ratones Lcn2<sup>-/-</sup>.** **A.** Tinción representativa de Verhoeff van Gieson. **B.** Inmunofluorescencia representativa de  $\alpha$ -actina (rojo) con contratinción de núcleos con DAPI (azul). **C y D.** Cuantificación mediante escala de grados de la conservación de las capas de elastina y de las CMLV en ratones WT (n=10) y Lcn2<sup>-/-</sup> (n=11) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. WT. Barras de escala: 100 $\mu$ m.



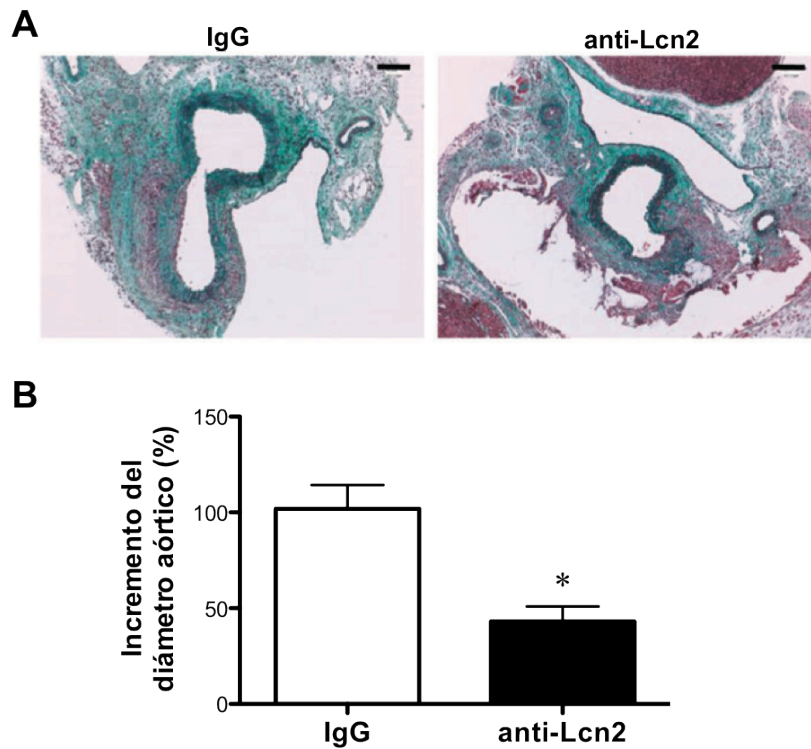
**Figura 33. Disminución de la neoangiogénesis en el AAA experimental de ratones Lcn2<sup>-/-</sup>.** **A.** Inmunohistoquímica representativa de CD31<sup>+</sup>. **B.** Cuantificación de los neovasos CD31<sup>+</sup> en las paredes aórticas de ratones WT (n=10) y Lcn2<sup>-/-</sup> (n=11) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. WT. Barras de escala: 100 $\mu$ m.

## **12 El tratamiento de ratones WT con un anticuerpo anti-Lcn2 limita la expansión del AAA inducido por elastasa**

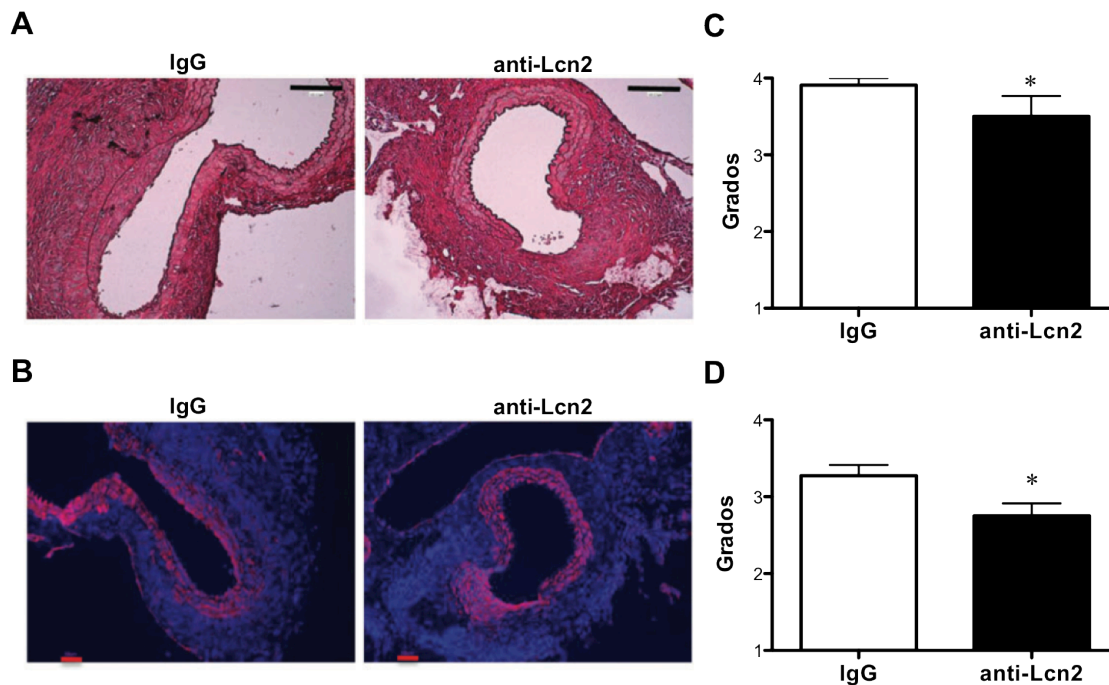
Para investigar el potencial de Lcn2 como diana terapéutica en el tratamiento del AAA, hemos generado un anticuerpo policlonal anti-Lcn2 mediante la inyección de proteína recombinante a un conejo. Se realizó western blot para confirmar la purificación de los anticuerpos y para su caracterización (**Figura 34A y 34B**). Su presencia en el suero de los ratones se muestra en la **Figura 34C**. El anticuerpo anti-Lcn2 o la IgG control fue inyectada por vía intravenosa en dosis iguales (100µg/ratón) desde un día antes de la perfusión con elastasa. El incremento en el diámetro aórtico inducido por la perfusión con elastasa fue menor en los ratones tratados con anti-Lcn2 que en los tratados con IgG control (**Figura 35**), así como una ligera reducción en el daño de las capas de elastina (**Figura 36A y 36C**). Además, el grupo tratado con anti-Lcn2 mostró una reducción en la pérdida de CMLV en comparación con el grupo control (**Figura 36B y 36D**). Por otra parte, el tratamiento con anti-Lcn2 también redujo el número de neovasos (**Figura 37**).



**Figura 34. Caracterización de los anticuerpos policlonales.** **A.** Western blot del anticuerpo control (IgG) y de los anticuerpos anti-Lcn2 neutralizantes (anti-Lcn2) purificados a partir de sueros de conejo. **B.** Detección de Lcn2 en suero murino utilizando el anticuerpo policlonal anti-Lcn2. **C.** Detección de IgG de conejo en el suero del ratón tras 14 días de la perfusión con elastasa. Carriles 1-3, ratones sin tratamiento; carriles 4 y 5, ratones inyectados con anti-Lcn2; carriles 6-8, ratones inyectados con IgG.

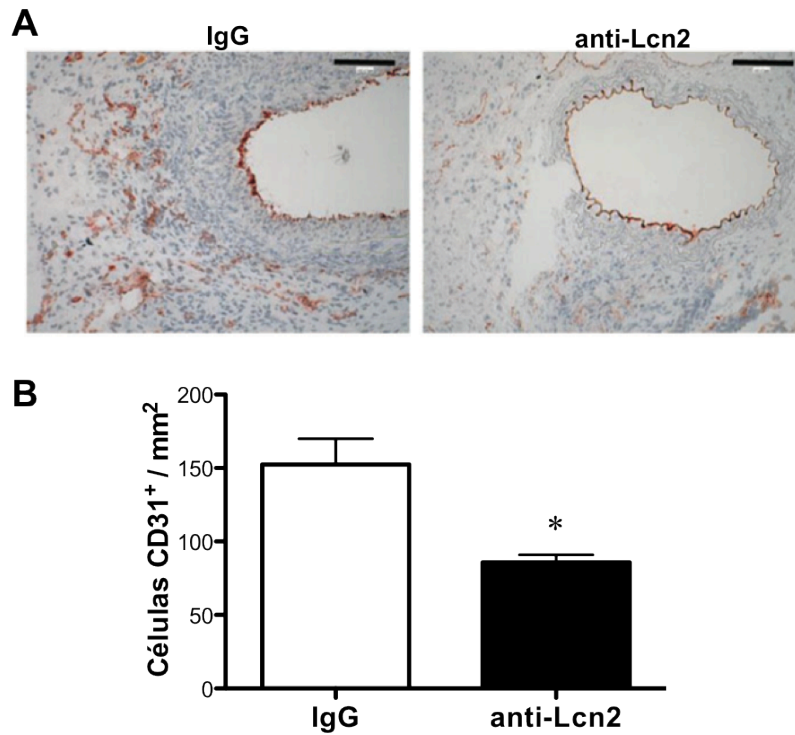


**Figura 35. El incremento del diámetro aórtico es menor en el AAA experimental de ratones tratados con anti-Lcn2.** A. Tinción representativa de tricrómico de Masson. B. Cuantificación del incremento del diámetro aórtico tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=11) o anti-Lcn2 (n=8). \*P<0,05 vs. IgG. Barras de escala: 100µm.



**Figura 36. Mayor conservación de la capa media en el AAA experimental de ratones tratados con anti-Lcn2.** A. Tinción representativa de Verhoeff van Gieson. B. Inmunofluorescencia representativa de  $\alpha$ -actina (rojo) con contratinción de núcleos con DAPI (azul). C y D. Cuantificación mediante escala de grados de la conservación de las capas de elastina y de las CMLV en ratones tratados con IgG (control, n=11) o anti-Lcn2 (n=8) tras 14 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. IgG. Barras de escala: 100µm.

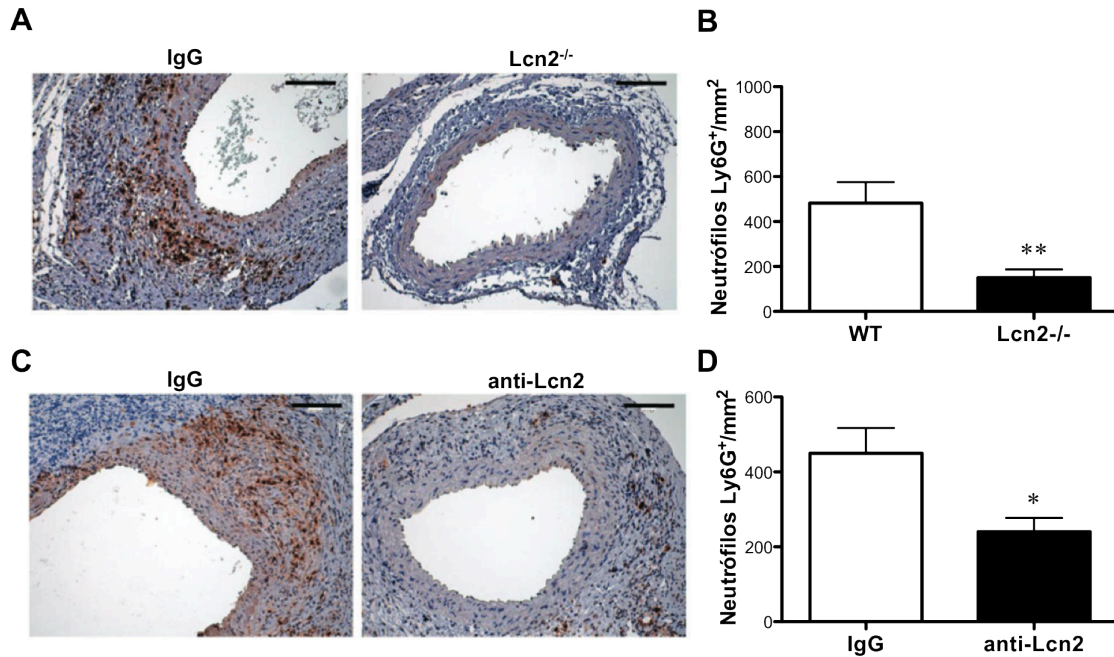




**Figura 37. Disminución de la neoangiogénesis en el AAA experimental de ratones tratados con anti-Lcn2. A.** Inmunohistoquímica representativa de CD31. **B.** Cuantificación de los neovasos CD31<sup>+</sup> en las paredes aórticas tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=11) o anti-Lcn2 (n=8). \*P<0,05 vs. IgG. Barras de escala: 100µm.

### **13 La deficiencia de Lcn2 o su inhibición mediante anti-Lcn2 disminuye la infiltración de neutrófilos y la actividad de metaloproteinasas**

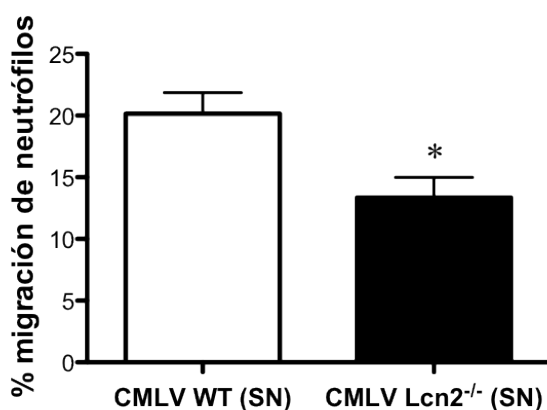
Para comprender porqué la deleción génica o la inhibición de Lcn2 protege de la formación del AAA, hemos estudiado si la disminución del daño estructural causado por la deficiencia de Lcn2 se encontraba asociada a una disminución de la respuesta inmunoinflamatoria. No hallamos diferencias ni en los niveles de linfocitos entre ratones WT y Lcn2<sup>-/-</sup> (119±29,08 frente a 99,85±18,12 células CD3<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> de área de lesión) ni en los de macrófagos (32,45±1,84 frente a 27,09±4,44% área MOMA2<sup>+</sup>/área total). Hemos observado que el número de neutrófilos es menor en los ratones Lcn2<sup>-/-</sup> y en aquellos tratados con anti-Lcn2 con respecto a los controles WT perfundidos con elastasa o tratados con la IgG control (**Figura 38**).



**Figura 38. La deficiencia de Lcn2 o su inhibición mediante anti-Lcn2 disminuye el reclutamiento de neutrófilos en el AAA experimental.** **A.** Inmunohistoquímica representativa de Ly6G en ratones WT y Lcn2<sup>-/-</sup>. **B.** Cuantificación de Ly6G en aortas de ratones WT (n=9) y Lcn2<sup>-/-</sup> (n=11). **C.** Inmunohistoquímica representativa de Ly6G en aortas de ratones tratados con IgG control o anti-Lcn2. **D.** Cuantificación de Ly6G en aortas tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=11) o anti-Lcn2 (n=8). \*P<0,05 vs. IgG. \*\*P<0,01 vs WT. Barras de escala: 100µm.

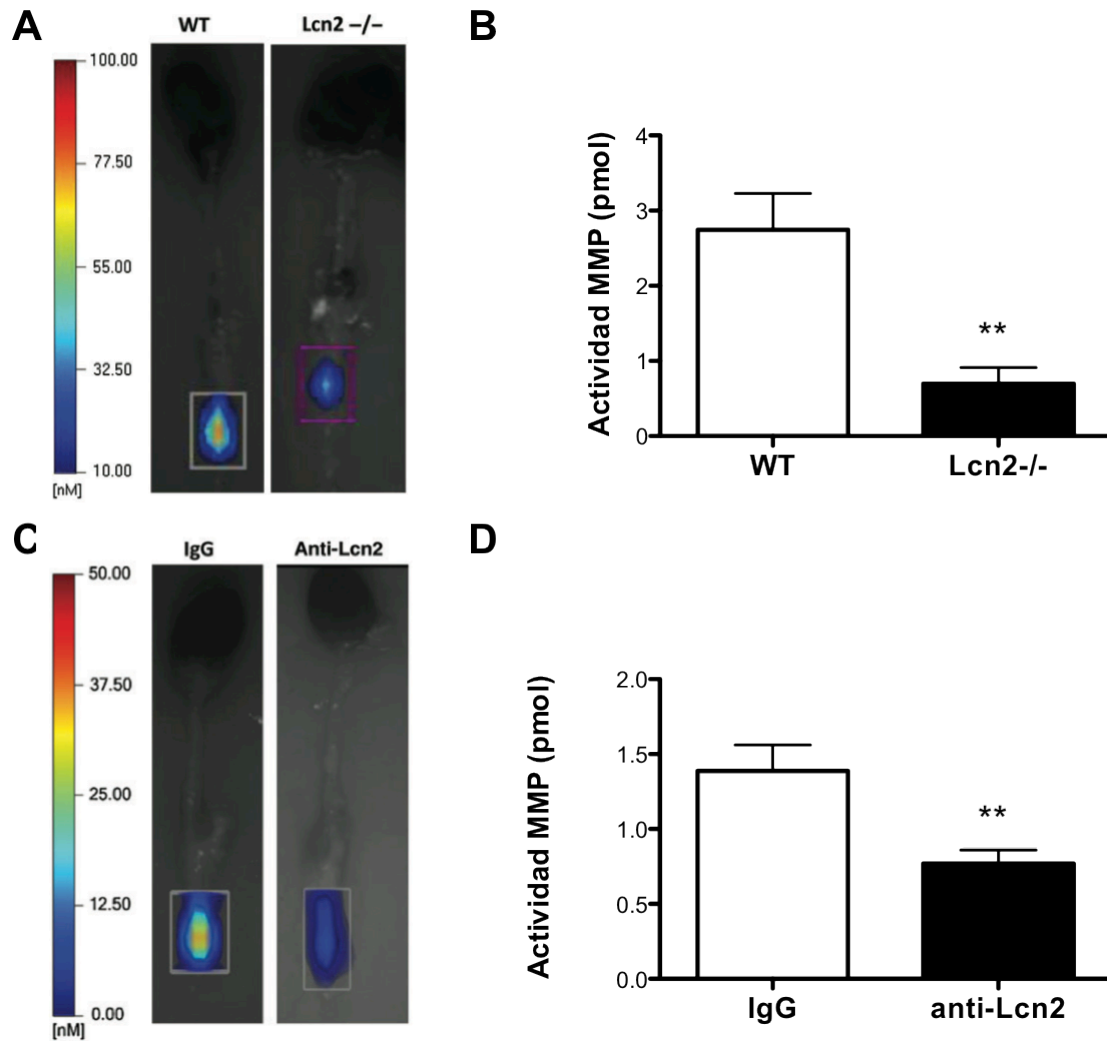
Previamente se ha descrito que los neutrófilos de ratones Lcn2<sup>-/-</sup> son deficientes en varias funciones, entre las que se ha descrito una reducción en la capacidad migratoria(170). Por otra parte, Lcn2 es un agente quimiotáctico para los neutrófilos, por lo que hipotetizamos que las CMLV de los ratones Lcn2<sup>-/-</sup> podrían tener una menor capacidad quimiotáctica para atraer neutrófilos, contribuyendo de esta forma a la reducción en el infiltrado de neutrófilos observada en la pared vascular. Por esta razón, hemos estudiado la capacidad de los neutrófilos de ratones con AAA experimentales aislados a partir de ratones perfundidos con elastasa y sacrificados después de 3 días (que corresponde a la máxima activación de neutrófilos) para migrar hacia sobrenadantes de CMLV procedentes de ratones WT y Lcn2<sup>-/-</sup>. Así, hemos observado un descenso en la capacidad de atraer neutrófilos por CMLV de ratones Lcn2<sup>-/-</sup> en comparación con las CMLV procedentes de ratones WT (**Figura 39**). Además, Lcn2 puede potenciar la activación de MMP-9(158, 159). Para determinar si la activación de MMP estaba

asociada a la reducción en la lesión de los ratones *Lcn2*<sup>-/-</sup>, 5 ratones WT y 7 *Lcn2*<sup>-/-</sup> fueron perfundidos con elastasa, y se cuantificó en ellos la actividad MMP en el AAA experimental mediante FMT a los 14 días. Los ratones *Lcn2*<sup>-/-</sup> mostraron un descenso significativo en la actividad de MMP en comparación con los ratones WT tras la inducción de AAA mediante perfusión de elastasa (**Figura 40A y 40B**). De forma similar, se observó una menor actividad MMP en las aortas de ratones tratados con anti-*Lcn2* en comparación con las del grupo tratado con IgG control (**Figura 40C y 40D**). Finalmente, se analizó la expresión de MMP-2, -3, -9 y -13 en CMLV de ratones tanto WT como *Lcn2*<sup>-/-</sup> para valorar el potencial efecto directo de *Lcn2* sobre la expresión de MMP. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de estas MMP en ninguno de los dos genotipos ( $5,7 \times 10^{-5} \pm 8 \times 10^{-6}$  frente a  $2,9 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$  para MMP-2;  $1,5 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$  frente a  $1,1 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-6}$  para MMP-3;  $2,9 \times 10^{-8} \pm 4 \times 10^{-9}$  frente a  $3,1 \times 10^{-8} \pm 2 \times 10^{-9}$  para MMP-9;  $2,1 \times 10^{-6} \pm 3 \times 10^{-7}$  frente a  $1,4 \times 10^{-6} \pm 2 \times 10^{-7}$  para MMP-13).



**Figura 39. Disminución en la actividad quimiotáctica del secretoma de CMLV de ratones *Lcn2*<sup>-/-</sup>.** Análisis mediante citometría de flujo de la migración de neutrófilos (marcados con Ly6G-PE) aislados de ratones WT (n=6) y *Lcn2*<sup>-/-</sup> (n=6) tras 3 días de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. WT.

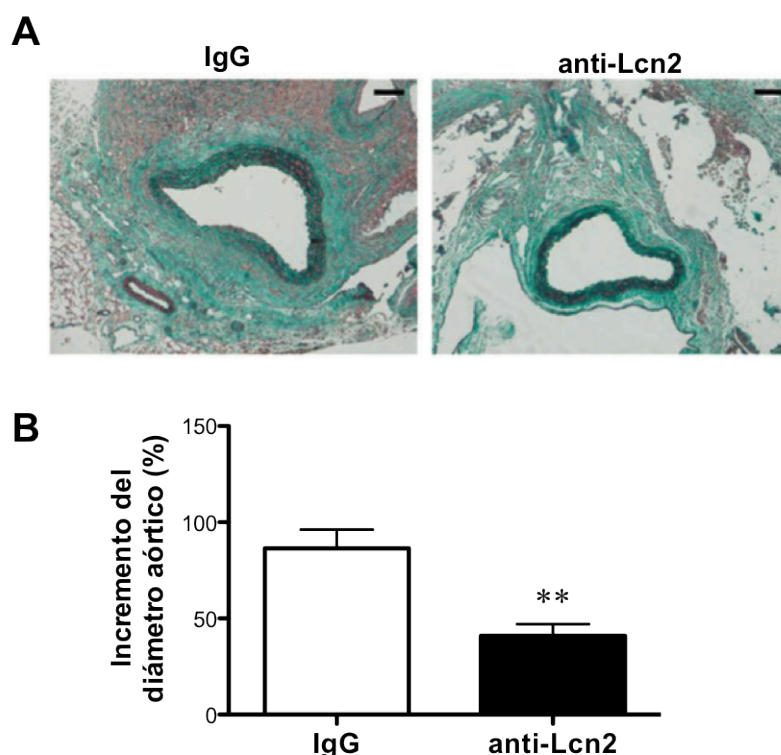




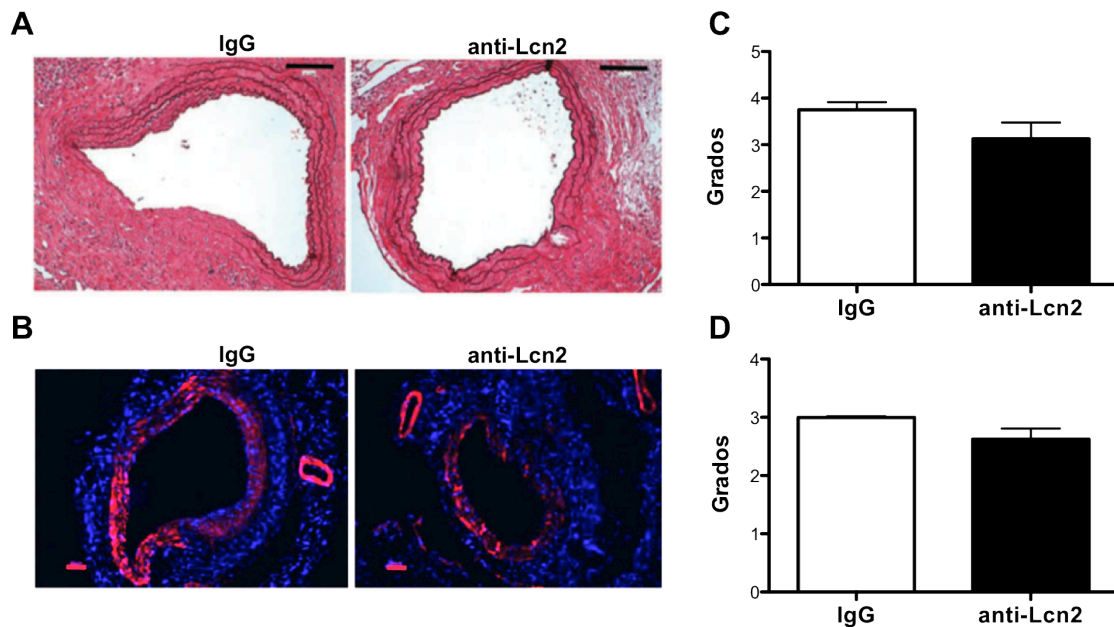
**Figura 40. La deficiencia de Lcn2 o su inhibición mediante anti-Lcn2 disminuye la actividad MMP.** **A.** Análisis representativo por FMT de la actividad MMP *ex vivo* de AAA experimentales en ratones WT y Lcn2<sup>-/-</sup> tras 14 días de la perfusión con elastasa. **B.** Cuantificación de la actividad MMP en las aortas de ratones WT (n=5) y Lcn2<sup>-/-</sup> (n=7). **C.** Análisis representativo por FMT de la actividad MMP *ex vivo* de AAA experimentales en ratones tratados con IgG control (n=11) o anti-Lcn2 (n=8) tras 14 días de la perfusión con elastasa. **D.** Cuantificación de la actividad MMP en las aortas de ratones tratados con IgG control (n=6) o anti-Lcn2 (n=5). \*\*P<0,01 vs. WT/IgG.

## **14 El tratamiento terapéutico con anti-Lcn2 reduce la progresión de los AAA inducidos por elastasa**

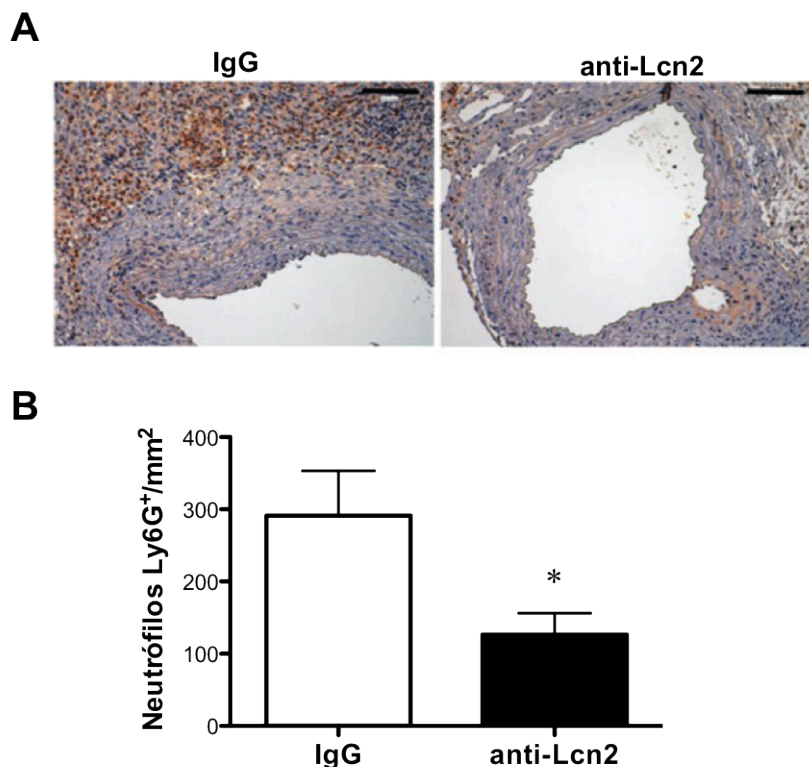
Para evaluar el papel de Lcn2 como potencial diana terapéutica en el tratamiento de AAA, los animales fueron tratados con anti-Lcn2 transcurridos 3 días desde la perfusión con elastasa, que coincide con el incremento inicial en el reclutamiento de neutrófilos). De esta forma, el tratamiento de la enfermedad se produce una vez que el AAA ya se ha desarrollado, representando así un modelo más traslacional que con el tratamiento preoperatorio. El incremento en el diámetro aórtico inducido por la perfusión con elastasa fue menor en los ratones tratados con anti-Lcn2 que en aquellos que recibieron IgG control (**Figura 41**). El grupo tratado con anti-Lcn2 también mostró un menor daño en las capas de elastina en comparación con el grupo tratado con IgG control, así como una menor pérdida de CMLV, aunque las diferencias no resultaron significativas (**Figura 42**). Por otra parte, el tratamiento con el anticuerpo anti-Lcn2 disminuyó el contenido de neutrófilos en el AAA en comparación con los ratones tratados con IgG control (**Figura 43**).



**Figura 41. El tratamiento con anti-Lcn2 disminuye la progresión de AAA experimentales pequeños. A.** Tinción representativa de tricrómico de Masson. **B.** Cuantificación del incremento del diámetro aórtico tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=8) o anti-Lcn2 (n=8) a partir del tercer día de la perfusión con elastasa. \*\*P<0,01 vs. IgG.



**Figura 42. Disminución del daño asociado a la capa media en AAA experimentales pequeños de ratones tratados con anti-Lcn2.** A y B. Tinción representativa de Verhoeff van Gieson e inmunofluorescencia representativa de  $\alpha$ -actina (rojo) con contratinción de núcleos con DAPI (azul). C. Cuantificación por escala de grados de la conservación de las láminas elásticas y de la estructura tisular conformada por las CMLV en ratones tratados con IgG (control) o anti-Lcn2 tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=8) o anti-Lcn2 (n=8) a partir del tercer día de la perfusión con elastasa. Barras de escala: 100 $\mu$ m.



**Figura 43. Disminución del infiltrado de neutrófilos en el AAA experimental de ratones tratados con anti-Lcn2.** A. Inmunohistoquímica representativa de CD31. B. Cuantificación de los neovasos CD31<sup>+</sup> en las paredes aórticas tras 14 días de la perfusión con elastasa en ratones tratados con IgG control (n=8) o anti-Lcn2 (n=8) a partir del tercer día de la perfusión con elastasa. \*P<0,05 vs. IgG. Barras de escala: 100 $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

---



## **1 Biomarcadores circulantes de aterotrombosis**

La mayoría de los pacientes con aterotrombosis son asintomáticos, por lo que la detección temprana puede ser clave para la prevención cardiovascular. Existe un gran interés en identificar biomarcadores de la enfermedad capaces, no sólo de hacer un diagnóstico precoz sino que, además, permitan facilitar el pronóstico de la enfermedad tanto en el momento del diagnóstico como a lo largo de su evolución. La identificación de biomarcadores persigue también un conocimiento más profundo de la fisiopatología y de sus correspondientes vías metabólicas. Finalmente, se plantea la posibilidad de emplear estos conocimientos en la búsqueda de dianas terapéuticas que, en un futuro, puedan llevarse a la práctica clínica como un tratamiento médico eficaz para este tipo de pacientes.

### **1.1 Galectina-3**

Galectina-3 es una proteína implicada en la regulación de la inflamación, y que ejerce diversas funciones relacionadas con el remodelado vascular patológico, entre las que se encuentran la quimiotaxis de leucocitos, la apoptosis o la producción de ROS. Su expresión se encuentra incrementada en tejidos cardiovasculares bajo las condiciones del remodelado patológico, por ejemplo cuando los macrófagos o las CMLV aórticas se cargan de lípidos y se transforman en células espumosas(171, 172), por lo que puede representar un buen biomarador patológico. En nuestro estudio, hemos mostrado que el PMA induce la expresión y liberación de Gal-3 en monocitos humanos aislados de sangre periférica y en un modelo *in vitro* de diferenciación monocito-macrófago en células THP-1. La apocinina revirtió estos efectos, sugiriendo que la inducción de Gal-3 por el PMA está mediada por la actividad NADPH oxidasa o por la generación de ROS. Por otra parte, Gal-3 induce la producción de ion superóxido en monocitos(173) y células mastocíticas(174) *in vitro*, lo que implica que podría estar contribuyendo a perpetuar el círculo vicioso que relaciona estrés oxidativo e inflamación. *In vivo*, hemos observado que los niveles plasmáticos de Gal-3 estaban asociados positivamente con la producción de superóxido dependiente de la NADPH oxidasa

en PBMC de sujetos asintomáticos. Estos datos podrían sugerir la posible participación de la producción de superóxido dependiente de la NADPH oxidasa en los niveles aumentados de Gal-3 observados en aterotrombosis. Sin embargo, en nuestros estudios no proporcionamos ninguna evidencia directa del potencial papel desempeñado por las NADPH oxidasas vasculares. Además de las NAD(P)H oxidasas, otras enzimas relacionadas con la producción de ROS en aterosclerosis, como LO, xantina oxidasa y NOS(175) podrían estar involucradas. En conjunto, los niveles extracelulares de Gal-3 podrían reflejar dos de los principales mecanismos de la aterogénesis, como son el estrés oxidativo y la diferenciación de macrófagos o formación de células espumosas.

Las funciones de Gal-3 dependen de su localización celular. A nivel intracelular, puede participar en vías de señalización y modular diferentes procesos como la migración celular y la apoptosis. A nivel extracelular, Gal-3 participa en la adhesión celular, en la producción de citoquinas, la quimiotaxis y la modulación de algunos receptores celulares. Los mecanismos implicados en la secreción de Gal-3 no se han establecido totalmente, aunque se han propuesto previamente la participación de los exosomas(139). En este sentido, se ha identificado Gal-3 mediante proteómica en exosomas derivados de células dendríticas y tumorales (139, 176). En nuestros estudios hemos mostrado que Gal-3 es liberado por células monocíticas activadas, mediado por ROS, y al menos en parte, asociado a exosomas, aunque otros mecanismos de secreción no relacionados con exosomas podrían estar implicados. Además, los niveles de Gal-3 que se encontraron en exosomas aislados de plasma estaban aumentados en pacientes con aterosclerosis en comparación con los sujetos control. Esto podría sugerir un incremento *in vivo* de la liberación de Gal-3 por monocitos activados (tal como ocurre en nuestros experimentos *in vitro*). Sin embargo, no podemos descartar la contribución de otros tipos celulares, ni un incremento pasivo/activo de la secreción mediada por un endotelio disfuncional/normal, como se ha mostrado previamente con micropartículas(177).



Existen diferentes estudios que resaltan el uso del IMT como marcador surrogado para la predicción del riesgo cardiovascular, aunque recientemente se ha sugerido que la evidencia de aterosclerosis (la propia placa de ateroma) se encuentra asociada de una forma más fuerte e independiente con los eventos cardiovasculares(178-180). En nuestros estudios, hemos mostrado que los niveles plasmáticos de Gal-3 se correlacionan con el IMT de sujetos asintomáticos tras el ajuste por los factores de riesgo clásicos. El papel de Gal-3 como potencial biomarcador circulante de ECV ha sido apoyado por diversos estudios, entre ellos los presentados en esta tesis. Así, hemos mostrado que los niveles plasmáticos de Gal-3 están incrementados en pacientes con aterosclerosis carotídea y PAD en comparación con sujetos control. También se han observado niveles plasmáticos incrementados en las fases agudas de la aterotrombosis(181). En la misma línea, Gal-3 también se encuentra incrementada en plasmas de pacientes con HF(182). Asimismo, en el segundo estudio de esta tesis, mostramos que Gal-3 se encuentra incrementada en los pacientes con AAA en comparación con los sujetos sanos. Los biomarcadores patológicos no son específicos de una enfermedad, sino que reflejan la actividad biológica asociada a la patología. Nuestros resultados sugieren que los niveles circulantes de Gal-3 se encuentran incrementados en distintas manifestaciones de la presencia de ECV, reflejando probablemente la activación subyacente de mecanismos patológicos comunes como el estrés oxidativo y la activación de monocitos.

El papel de Gal-3 como biomarcador pronóstico también se ha evaluado previamente. De hecho, sus niveles plasmáticos predicen HF y/o muerte cardiovascular en estudios realizados en grandes poblaciones(183-186). En relación al AAA, hemos observado niveles incrementados de Gal-3 en pacientes con AAA respecto a los controles, y además existe una fuerte correlación positiva entre niveles aumentados de Gal-3 y la tasa de intervención quirúrgica de forma independiente al tamaño aórtico, así como de otros factores. Nuestros datos indican que Gal-3 es un buen biomarcador pronóstico que predice la intervención quirúrgica causada por el crecimiento del AAA, que ocurre en determinados momentos de aceleración y es impredecible. En este estudio, aquellos pacientes con concentraciones séricas de Gal-3 inferiores a la mediana, presentaron una

menor tasa de intervención quirúrgica, asociada a un menor crecimiento del AAA. Para determinar la potencial asociación entre las concentraciones de Gal-3 y la evolución clínica en aterotrombosis, hemos investigado la utilidad de los niveles séricos para predecir la muerte en una población sintomática de PAD. También hemos observado que los niveles de Gal-3 estaban asociados independientemente y de forma significativa con un incremento en el riesgo de muerte cardiovascular en pacientes de PAD. Aquellos pacientes con concentraciones de Gal-3 superiores a la mediana tuvieron el doble de riesgo de muerte en 5 años en comparación con aquellos con niveles por debajo de la mediana, de forma independiente a la CRP. Los niveles séricos de Gal-3 predijeron de forma independiente un pronóstico adverso en pacientes con HF, donde se encontró el mismo incremento en el riesgo (x2) en pacientes con niveles de Gal-3 superiores a la mediana(187). Gal-3 también ha sido asociada con la evolución clínica en cáncer y en la población en general. Sin embargo, en la población general, el incremento de riesgo por niveles aumentados fue sólo del 9% a causa de la desviación típica(188). En ese estudio, las mujeres tuvieron niveles más altos de Gal-3, así como una asociación más fuerte con los factores de riesgo cardiovasculares, lo que no ocurrió en nuestro estudio, probablemente, debido a que las mujeres de nuestro estudio ya estaban enfermas y tuvieran más características clínicas en común con la población masculina de PAD. En conjunto, los resultados sugieren que las concentraciones de Gal-3 circulante están asociadas con la evolución clínica de pacientes con ECV. Una de las fortalezas de nuestros estudios reside en que el reclutamiento de todos los pacientes de PAD y AAA se realizó de forma consecutiva, por lo que todos fueron atendidos en un único centro de cirugía vascular del hospital de distrito. Esto asegura que los pacientes que son remitidos para la evaluación quirúrgica representan una población bien definida. Por otra parte, estos estudios son descriptivos, y no están basados en una población verdadera, ya hay muchos sujetos asintomáticos en la población que no fueron reclutados. Además, a pesar de que los resultados se han ajustado por diversos factores de confusión para el riesgo cardiovascular, aún podrían persistir otros factores que interfieran, especialmente debido a la falta de posibilidad de ajustar por HF y cánceres coexistentes.

En conclusión, Gal-3 posee características únicas para ser un buen biomarcador patológico de aterotrombosis, como el aumento de expresión en macrófagos activados y CMLV en la pared vascular patológica, o el incremento de su liberación a la sangre en aterosclerosis tanto clínica como subclínica. Asimismo, hemos mostrado que los niveles incrementados de Gal-3 también están asociados a la progresión del AAA. Las concentraciones de Gal-3 circulante se asocian con la evolución clínica en pacientes con ECV. Sin embargo, se necesitan estudios futuros que valoren la utilidad clínica de la determinación de Gal-3 en la predicción del riesgo cardiovascular.

## **2 Nuevas dianas terapéuticas en AAA**

Actualmente no existe ningún tratamiento específico que sea capaz de detener la progresión del AAA. La mayoría de aproximaciones terapéuticas están basadas en rutas de señalización que dirigen procesos inmunoinflamatorios, pero es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad para investigar la modulación de nuevas dianas terapéuticas. En esta tesis hemos empleado la deleción génica y la inhibición farmacológica de nuevos biomarcadores para estudiar su efecto sobre el AAA experimental inducido por elastasa y valorar sus potenciales efectos terapéuticos.

### **2.1 Galectina-3**

La expresión de Gal-3 está incrementada a nivel tanto de transcripción como de traducción en el corazón durante el periodo inicial de isquemia(189), y está incrementada en aortas de conejos hipercolesterolémicos y en aortas de ratas tras un modelo de lesión arterial(148), por lo que ha sido asociada previamente con diferentes mecanismos subyacentes a la aterogénesis, como la inflamación y el estrés oxidativo. La expresión de Gal-3 también se encuentra aumentada cuando los macrófagos o las CMLV aórticas se cargan de lípidos y se transforman en

células espumosas(171, 172), sugiriendo que Gal-3 podría ser un marcador del cambio de fenotipo de las CMLV(171). Gal-3 ha sido relacionada con la diferenciación osteogénica(144) y con la respuesta fibrótica a aldosterona en CMLV *in vivo* e *in vitro*(143). Ambos procesos son de gran relevancia durante el remodelado vascular patológico, ya que la pared de AAA humano se caracteriza por la presencia de cristales de colesterol y depósitos de hierro asociados a un proceso de fagocitosis, en paralelo a una respuesta inmunoinflamatoria, fibrosis, angiogénesis y calcificación(190).

La expresión de Gal-3 está incrementada en el aneurisma sacular intracraneal inducido por elastasa(191). En la misma línea, hemos mostrado que la expresión de Gal-3 está incrementada en la pared vascular del AAA humano y en la del AAA murino experimental inducido por elastasa. Además, la presencia de Gal-3 está asociada tanto a los macrófagos como a las CMLV de la pared de AAA humano. De momento, no podemos distinguir si el aumento de expresión de Gal-3 en el AAA humano y experimental refleja un aumento en el reclutamiento de leucocitos o de CMLV diferenciadas, o si desempeña otros roles como mediador del AAA. La inhibición de Gal-3 se ha empleado a través de distintas aproximaciones para prevenir la ECV de forma satisfactoria a nivel experimental(143, 147, 192, 193). La inhibición de Gal-3 mediante MCP reduce el volumen de placa de ateroma en ratones ApoE<sup>-/-</sup>(150). A través de la unión de ligandos neutralizantes como el MCP, Gal-3 sufre cambios conformacionales, forma pentámeros y pierde su actividad(194). En nuestro modelo de AAA experimental murino, el tratamiento con MCP redujo la expansión del AAA en comparación con los controles. La degradación de elastina y la disminución en contenido de CMLV son dos de las principales características de la media dañada del AAA. Las capas de elastina son uno de los principales componentes estructurales de la aorta, y consecuentemente, su degradación es un proceso inicial clave que permite la dilatación del vaso(195). El descenso observado en el diámetro aórtico del AAA en los ratones tratados con MCP estuvo acompañado de una reducción en la degradación de las capas de elastina y por un mayor contenido de CMLV.

Como consecuencia de la lesión en la capa media del AAA, se produce una respuesta inmunoinflamatoria en la adventicia, caracterizada por la presencia de células inflamatorias, citoquinas y quimioquinas(82). Previamente se ha mostrado un incremento en la expresión de citoquinas y quimioquinas – incluyendo CCL-2 – en la pared de AAA humano(196). Además, otro estudio demuestra la necesidad de la quimioquina CCL-2 derivada de los macrófagos de médula ósea para el desarrollo del AAA experimental(197). Gal-3 ha sido relacionada con las respuestas proinflamatorias y es un potente agente quimiotáctico para monocitos y macrófagos, potenciando así el reclutamiento de estas células en la pared arterial(198). Hemos mostrado que la inhibición de Gal-3 mediante MCP disminuye el infiltrado de macrófagos en la pared del AAA experimental. En este sentido, hay estudios previos que han mostrado una disminución en el infiltrado de células inflamatorias en la adventicia de ratones Gal-3<sup>-/-</sup>(147). Gal-3 actúa de forma autocrina y paracrina, promoviendo la liberación de mediadores proinflamatorios. Induce la secreción de CCL-2 en fibroblastos(199), y su inhibición, mediante silenciamiento génico o farmacológicamente mediante el MCP, reduce la expresión de CCL-2 en la aorta(143). En nuestro estudio, hemos mostrado que el tratamiento con MCP disminuye la expresión de CCL-2 en la pared del AAA experimental. En conjunto, estos datos sugieren que Gal-3 podría ser una diana terapéutica efectiva en la prevención del remodelado cardiovascular patológico. Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos para investigar los potenciales beneficios del uso de MCP en pacientes de insuficiencia cardíaca (ClinicalTrials.gov, identificador NCT01960946).

## ***2.2 Lcn2/NGAL***

En los últimos años, la potencial utilidad de NGAL como biomarcador de ECV ha captado gran interés. Se han observado niveles sistémicos incrementados de NGAL en pacientes de infarto de miocardio, aterosclerosis y AAA(161, 200, 201). Además, los niveles altos de NGAL están asociados a un incremento en el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares y del riesgo total de muerte(165). En este estudio, hemos demostrado que NGAL/Lcn2 no es únicamente un biomarcador de AAA, sino un mediador involucrado en el desarrollo de la enfermedad. En estudios previos se ha mostrado que la expresión de NGAL se encuentra aumentada en placas de ateroma, y que este aumento se correlaciona con características presentes en placas inestables, como la hemorragia intraplaca(202, 203). Otro estudio ha mostrado la presencia de inmunofluorescencia positiva para NGAL en pared y trombo de AAA humano, que colocaliza con áreas de activación de MMP(161, 162). En nuestro estudio, hemos demostrado que la expresión de NGAL se encuentra incrementada en la pared de AAA humano en comparación con aortas sanas, tanto a nivel de transcripción como de traducción. A nivel experimental, se ha mostrado previamente que Lcn2 es altamente inducido en la capa íntima tras la angioplastia en un modelo de lesión arterial carotídea en ratas(204). En nuestro estudio, hemos observado que Lcn2 está aumentado en la pared aórtica murina y en plasma, en respuesta a la formación del AAA inducido por elastasa, sugiriendo que la expresión de Lcn2 aumenta tras el daño vascular. Sin embargo, no podemos determinar si el incremento en la expresión de NGAL/Lcn2 en el AAA humano y experimental refleja un aumento en el reclutamiento de leucocitos, o si NGAL/Lcn2 desempeña otro rol como mediador del AAA.

En nuestro modelo de AAA experimental inducido por elastasa, la deficiencia de Lcn2 o su tratamiento preoperatorio neutralizante produjeron una disminución en la progresión del AAA en comparación con los controles. El descenso observado en el diámetro aórtico del AAA en ratones Lcn2<sup>-/-</sup> o tratados antes de la cirugía con anti-Lcn2 estuvo acompañado de una reducción en la degradación de las capas de elastina, de un mayor contenido de CMLV y de un menor número de neovasos. Las capas de elastina son uno de los principales componentes estructurales de la aorta, y consecuentemente, su degradación es un proceso inicial clave, que permite la

dilatación del vaso(195). Por otra parte, la pérdida de CMLV por apoptosis es uno de los pasos críticos en la desestabilización del aneurisma(205), aunque el papel de Lcn2 en la apoptosis continúa siendo controvertido, con estudios que indican papeles tanto inhibitorios como potenciadores(206-208). La angiogénesis constituye otro de los grandes procesos asociados a la expansión del AAA. Respecto a Lcn2, al igual que en la apoptosis, existen datos contradictorios que sugieren tanto la inhibición como la promoción de la angiogénesis, dependiendo del tipo celular y de la enfermedad estudiada(209-212). En nuestro estudio, hemos observado un incremento en el contenido de CMLV y una disminución en el número de neovasos en los AAA experimentales de ratones ratones Lcn2<sup>-/-</sup> o tratados antes de la cirugía con anti-Lcn2. Estos datos podrían sugerir un papel proapoptótico y proangiogénico de Lcn2, pero no podemos descartar la posibilidad de que la preservación de CMLV y el descenso en la neovascularización correspondan con efectos indirectos de la inhibición de Lcn2 que reflejen un menor daño en la pared vascular. En cualquier caso, nuestro estudio sugiere que Lcn2 es un mediador implicado en la formación y expansión del AAA.

Los procesos inmunoinflamatorios son signos del remodelado vascular patológico que tiene lugar en el AAA. Nuestro análisis de la composición celular del AAA determinó que sólo el contenido de neutrófilos se encontraba significativamente disminuido en ratones Lcn2<sup>-/-</sup> o tratados antes de la cirugía con anti-Lcn2 con respecto a los controles. Se ha descrito previamente que los neutrófilos de ratones Lcn2<sup>-/-</sup> tienen una menor capacidad migratoria(170). Lcn2 modula la función y la migración de neutrófilos(157, 159) y en nuestro estudio hemos mostrado que las CMLV de ratones Lcn2<sup>-/-</sup> poseen una menor capacidad quimiotáctica para atraer neutrófilos aislados de ratones con AAA. En conjunto, la función defectuosa de los neutrófilos y la disminución de la capacidad quimiotáctica de las CMLV en ratones Lcn2<sup>-/-</sup> podría contribuir al descenso del infiltrado de neutrófilos observado en la pared del AAA.

Además, Lcn2 regula la estabilidad de MMP-9 y su activación. Aunque intervienen numerosas enzimas en las alteraciones que se producen en el vaso durante el desarrollo del AAA, las MMP constituyen una familia de mediadores cruciales en el

remodelado patológico(213-215). En nuestro estudio, hemos observado que los ratones deficientes en *Lcn2* muestran un descenso de la actividad MMP en el AAA, lo que podría explicar la menor degradación de las capas de elastina. Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de MMP en CMLV aisladas de ratones WT y *Lcn2*<sup>-/-</sup>, sugiriendo que el efecto observado sobre la actividad MMP podría ser derivado del descenso en el reclutamiento de neutrófilos. Nuestro estudio sugiere que *Lcn2* participa en la patogenia del AAA a través de la quimiotaxis de neutrófilos.

Las aproximaciones terapéuticas experimentales en el AAA han sido diseñadas para modular células/mediadores de rutas de señalización patogénicas conocidas y por lo tanto tienen como dianas principalmente la proteólisis y los procesos inmunoinflamatorios(216). Dado que las células y los mediadores inmunoinflamatorios se encuentran presentes de forma abundante en el AAA humano y experimental, se han investigado diferentes terapias potenciales como la modulación de linfocitos T y B, monocitos, mastocitos y neutrófilos, así como de las citoquinas asociadas(82). Diferentes estudios en los que se disminuye el número, la activación o la capacidad de infiltración de los neutrófilos, de formas directas o indirectas, han mostrado una disminución en la expansión del AAA(217-219). De forma similar, se han propuesto estrategias con proteasas como dianas terapéuticas, principalmente MMP(220-222). Sin embargo, la traslación de estas aproximaciones a la realidad clínica no ha sido satisfactoria. En este sentido, dos ensayos clínicos recientes han mostrado que ni la inhibición de mastocitos mediante tratamiento con pemirolast ni la inhibición de MMP por doxiciclina reducen el crecimiento del AAA en pacientes(223, 224). Nosotros hipotetizamos que una terapia experimental basada en un tratamiento con anticuerpo anti-*Lcn2* podría proteger de la progresión del AAA. Tratamos a los ratones con el anticuerpo a partir del tercer día de la perfusión con elastasa para realizar un modelo de AAA pequeño, basándonos en estudios que sugieren que la infiltración de neutrófilos ocurre mayoritariamente durante esos tres primeros días tras la cirugía(225-227). En este estudio mostramos que la administración terapéutica del anticuerpo policlonal anti-*Lcn2* a ratones WT tras tres días de la perfusión con elastasa reduce el tamaño del AAA mediante un descenso en el número de neutrófilos. Por ello,



nuestros resultados demuestran que el tratamiento con anti-Lcn2 puede prevenir el desarrollo/crecimiento del AAA (al menos en ratones) a través de un descenso en el reclutamiento de neutrófilos.

En conclusión, la inhibición farmacológica de Gal-3 reduce la evolución del AAA experimental mediante la modulación del infiltrado de macrófagos, por lo que nuestros datos sugieren su potencial papel como diana terapéutica en el AAA. Asimismo, nuestros estudios demuestran que Lcn2 está implicado en la patogenia del AAA mediante la modulación del reclutamiento de neutrófilos. La administración del anticuerpo anti-Lcn2 disminuye el desarrollo del AAA experimental murino, sugiriendo su potencial utilidad como diana terapéutica para la prevención de la progresión del AAA en humanos.



## CONCLUSIONES

---



- 1. La liberación de Gal-3 se incrementa durante la diferenciación monocito-macrófago, en un proceso regulado por ROS y en el que intervienen exosomas.**
- 2. Los niveles plasmáticos de Gal-3 se correlacionan con la actividad NADPH oxidasa y con el IMT en sujetos asintomáticos, y están incrementados en aterosclerosis carotídea, PAD y AAA.**
- 3. Las concentraciones de Gal-3 se asocian de forma significativa e independiente a la progresión del AAA y a un incremento en el riesgo de mortalidad cardiovascular en pacientes con PAD.**
- 4. La expresión de Gal-3 está aumentada en la pared vascular de AAA humano y experimental, y colocaliza con macrófagos y CMLV.**
- 5. La inhibición farmacológica de Gal-3 reduce la progresión del AAA en ratones mediante la disminución en el reclutamiento de monocitos, posiblemente asociado a una menor expresión de la quimioquina CCL-2.**
- 6. La expresión de NGAL/Lcn2 se encuentra incrementada en la pared vascular de AAA humano y experimental, y colocaliza con neutrófilos y CMLV.**
- 7. La deficiencia de Lcn2, bien por delección génica, bien por administración preoperatoria del anticuerpo anti-Lcn2, disminuye la progresión del AAA en ratones a través de un menor reclutamiento de neutrófilos.**
- 8. El tratamiento terapéutico con anti-Lcn2 de ratones con AAA reproduce parcialmente los resultados obtenidos en los modelos de administración preoperatoria.**

En conclusión, nuestros datos demuestran el valor predictivo de Gal-3 en pacientes con distintas manifestaciones de aterotrombosis. Por otra parte, la inhibición de los mediadores proinflamatorios, Gal3 y Lcn2, ha demostrado ser efectiva en el tratamiento del AAA experimental, lo que sugiere su papel como dianas terapéuticas en pacientes con AAA.



## BIBLIOGRAFÍA

---





1. Murray CJ, *et al.* Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2197-223.
2. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;385(9963):117-71.
3. Sampson UK, *et al.* Global and regional burden of death and disability from peripheral artery disease: 21 world regions, 1990 to 2010. *Glob Heart.* 2014;9(1):145-58.
4. Libby P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(7):1225-8.
5. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, *et al.* The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet.* 2012;380(9841):581-90.
6. Lonn E, *et al.* Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;293(11):1338-47.
7. Lonn E, *et al.* Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006;354(15):1567-77.
8. Ridker PM, *et al.* Effects of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation.* 2012;126(23):2739-48.
9. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(4):431-8.
10. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(3):509-15.
11. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature.* 2011;473(7347):317-25.
12. Bäck M, Weber C, Lutgens E. Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. *J Intern Med* 2015;278(5):462-82.
13. Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116(16):1832-44.
14. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):36-46.
15. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(5):1104-15.
16. Getz GS, Reardon CA. Use of Mouse Models in Atherosclerosis Research. *Methods Mol Biol* 2015;1339:1-16.

17. Wissler RW, *et al.* Production of lipomatous and atheromatous arterial lesions in the albino rat. *AMA Arch Pathol* 1954;57(4):333-51.
18. Zhang SH, *et al.* Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468-71.
19. Ishibashi S, *et al.* Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest* 1994;93(5):1885-93.
20. Nordon IM, *et al.* Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011;8(2):92-102.
21. Sandford RM, *et al.* The genetic basis of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007;33(4):381-90.
22. Earnshaw JJ, *et al.* Screening for abdominal aortic aneurysms in men. *BMJ*. 2004;328(7448):1122-4.
23. Rutherford RB. *Cirugía Vasculuar*. Elsevier España SA. 2006;6ª edición.
24. Hellenthal FA, *et al.* Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nat Rev Cardiol* 2009;6(8):543-52.
25. Vardulaki KA, *et al.* Quantifying the risks of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2000;87(2):195-200.
26. Lederle FA, *et al.* Abdominal aortic aneurysm events in the women's health initiative: cohort study. *BMJ*. 2008;337:a1724.
27. Norman PE, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. *Circulation*. 2007;115(22):2865-9.
28. Larsson E, *et al.* A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2009;49(1):47-50; discussion 1.
29. Wilmink TB, Quick CR, Day NE. The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1999;30(6):1099-105.
30. Knuutinen A, *et al.* Smoking affects collagen synthesis and extracellular matrix turnover in human skin. *Br J Dermatol*. 2002;146(4):588-94.
31. Brady AR, *et al.* Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation*. 2004;110(1):16-21.
32. Golledge J, *et al.* Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol* 2010;105(10):1480-4.
33. Rizzo M, *et al.* LDL size and subclasses in patients with abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol*. 2009;134(3):406-8.
34. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365(9470):1577-89.
35. Houard X, *et al.* Topology of the fibrinolytic system within the mural thrombus of human abdominal aortic aneurysms. *J Pathol*. 2007;212(1):20-8.

36. Lindholt JS, *et al.* Low-dose aspirin may prevent growth and later surgical repair of medium-sized abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg* 2008;42(4):329-34.
37. Houard X, *et al.* Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):532-41.
38. Michel JB, *et al.* Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res* 2011;90(1):18-27.
39. Chaer RA, *et al.* Models of abdominal aortic aneurysm: characterization and clinical applications. *Vascular.* 2006;14(6):343-52.
40. Silence J, *et al.* Persistence of atherosclerotic plaque but reduced aneurysm formation in mice with stromelysin-1 (MMP-3) gene inactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(9):1440-5.
41. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002;90(8):897-903.
42. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(3):429-34.
43. Pyo R, *et al.* Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1641-9.
44. Lizarbe TR, *et al.* Nitric oxide induces the progression of abdominal aortic aneurysms through the matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1421-30.
45. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 2015;4:180-3.
46. Valko M, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.
47. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol* 2011;106(5):735-47.
48. D'Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(10):813-24.
49. Drummond GR, *et al.* Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(6):453-71.
50. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
51. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381-478.
52. Steinbrecher UP. Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J Biol Chem.* 1987;262(8):3603-8.

53. McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(3):461-9.
54. Dubick MA, *et al.* Aortic ascorbic acid, trace elements, and superoxide dismutase activity in human aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;184(2):138-43.
55. Dubick MA, *et al.* Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurysmal and occlusive disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220(1):39-45.
56. Zhang J, *et al.* Inducible nitric oxide synthase is present in human abdominal aortic aneurysm and promotes oxidative vascular injury. *J Vasc Surg.* 2003;38(2):360-7.
57. Yajima N, *et al.* Oxidative stress is involved in the development of experimental abdominal aortic aneurysm: a study of the transcription profile with complementary DNA microarray. *J Vasc Surg.* 2002;36(2):379-85.
58. Viedt C, *et al.* Role of p22phox in angiotensin II and platelet-derived growth factor AA induced activator protein 1 activation in vascular smooth muscle cells. *J Mol Med (Berl).* 2004;82(1):31-8.
59. Vázquez-Medina JP, *et al.* The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 modulates NADPH oxidase 2 activation via lysophosphatidic acid receptor signaling in the pulmonary endothelium and alveolar macrophages. *FASEB J* 2016;30(8):2885-98.
60. Balla J, *et al.* Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(12):2119-37.
61. Godbole AS, *et al.* NADPH oxidase has a directional response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(1):H152-8.
62. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35.
63. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420(6917):846-52.
64. Kwak BR, *et al.* Biomechanical factors in atherosclerosis: mechanisms and clinical implications. *Eur Heart J* 2014;35(43):3013-20, 20a-20d.
65. Fogelstrand P, Borén J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22(1):1-7.
66. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7(10):803-15.
67. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145(3):341-55.
68. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
69. Lee S, *et al.* Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(2):317-26.

70. Stöger JL, *et al.* Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):461-8.
71. Rubio-Navarro A, *et al.* Hemoglobin induces monocyte recruitment and CD163-macrophage polarization in abdominal aortic aneurysm. *Int J Cardiol* 2015;201:66-78.
72. Drechsler M, *et al.* Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*. 2010;122(18):1837-45.
73. Ernst E, *et al.* Leukocytes and the risk of ischemic diseases. *JAMA* 1987;257(17):2318-24.
74. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 2013;38(6):1092-104.
75. Ylä-Herttuala S, *et al.* Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(12):5252-6.
76. Zhou Z, *et al.* Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab* 2011;13(5):592-600.
77. Davis FM, Rateri DL, Daugherty A. Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Curr Opin Cardiol* 2015;30(6):566-73.
78. Bäck M, Hansson GK. Leukotriene receptors in atherosclerosis. *Ann Med*. 2006;38(7):493-502.
79. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu Rev Immunol* 2007;25:101-37.
80. Weber C, Zerneck A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(10):802-15.
81. Petri MH, Laguna-Fernández A, Gonzalez-Diez M. The role of the FPR2/ALX receptor in atherosclerosis development and plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2015;105(1):65-74.
82. Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(8):1746-55.
83. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):987-94.
84. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23):2129-38
85. Libby P, Lee RT. Matrix matters. *Circulation*. 2000;102(16):1874-6.

86. Galis ZS, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94(6):2493-503.
87. Busuttill RW, Abou-Zamzam AM, Machleder HI. Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg*. 1980;115(11):1373-8.
88. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*. 2003;59(4):812-23.
89. Liang J, *et al.* Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation*. 2006;113(16):1993-2001.
90. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012;56(5-6):232-44.
91. Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol* 2006;17(5):556-61.
92. Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(9):959-67
- .
93. Zalba G, *et al.* Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(3):587-93.
94. Miller FJ Jr, *et al.* Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(4):560-5.
95. Xiong W, *et al.* Inhibition of reactive oxygen species attenuates aneurysm formation in a murine model. *Atherosclerosis*. 2009;202(1):128-34.
96. Freestone T, *et al.* Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(8):1145-51.
97. Arenas IA, *et al.* Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(4):C779-84.
98. Montero I, *et al.* C-reactive protein induces matrix metalloproteinase-1 and -10 in human endothelial cells: implications for clinical and subclinical atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(7):1369-78.
99. Curci JA, *et al.* Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest* 1998;102(11):1900-10.
100. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(12):2146-54.
101. Meilhac O, *et al.* Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J* 2003;17(10):1301-3.

102. Fontaine V, *et al.* Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* 2004;164(6):2077-87.
103. Vicencio JM, *et al.* Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 2008;54(2):92-9.
104. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 2011;106(5):749-60.
105. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
106. Henderson EL, *et al.* Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1999;99(1):96-104.
107. Vijaynagar B, *et al.* Potential role for anti-angiogenic therapy in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(7):758-65.
108. Xu J, Lu X, Shi GP. Vasa vasorum in atherosclerosis and clinical significance. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):11574-608.
109. Yamashita A, Shoji K, Tsuruda T. Medial and adventitial macrophages are associated with expansive atherosclerotic remodeling in rabbit femoral artery. *Histol Histopathol* 2008;23(2):127-36.
110. Dunmore BJ, *et al.* Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg.* 2007;45(1):155-9.
111. Choke E, *et al.* Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:315-9.
112. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. *Acta Physiol (Oxf)* 2015;213(3):539-53.
113. Moreno PR, *et al.* Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2004;110(14):2032-8.
114. Choke E, *et al.* Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(9):2077-82.
115. Hellenthal FA, *et al.* Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(7):464-74.
116. Martín-Ventura JL, *et al.* Biomarkers in cardiovascular medicine. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(6):677-88.
117. Kastelein JJ, Wiegman A, de Groot E. Surrogate markers of atherosclerosis: impact of statins. *Atheroscler Suppl.* 2003;4(1):31-6.
118. Folsom AR, *et al.* Circulating Biomarkers and Abdominal Aortic Aneurysm Incidence: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation* 2015;132(7):578-85.

119. Anderson JL. Lipoprotein-associated phospholipase A2: an independent predictor of coronary artery disease events in primary and secondary prevention. *Am J Cardiol.* 2008;101(12A):23F-33F.
120. Davidson MH, *et al.* Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol.* 2008;101(12A):51F-7F.
121. Lerman A, McConnell JP. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a risk marker or a risk factor? *Am J Cardiol* 2008;101(12A):11F-22F.
122. Pincemail J, *et al.* On the potential increase of the oxidative stress status in patients with abdominal aortic aneurysm. *Redox Rep.* 2012;17(4):139-44.
123. Eugster T, *et al.* Aminoterminal propeptide of type III procollagen and matrix metalloproteinases-2 and -9 failed to serve as serum markers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(4):378-82.
124. Tayebjee MH, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* 2004;17(9):764-9.
125. Martin-Ventura JL, *et al.* Low plasma levels of HSP70 in patients with carotid atherosclerosis are associated with increased levels of proteolytic markers of neutrophil activation. *Atherosclerosis.* 2007;194(2):334-41.
126. Beaudoux JL, *et al.* Serum matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 as potential markers of carotid atherosclerosis in infraclinical hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2003;169(1):139-46.
127. Vlassov AV, *et al.* Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):940-8.
128. Bang C, Thum T. Exosomes: new players in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):2060-4.
129. Théry C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep.* 2011;3:15.
130. McGinn CM, *et al.* Microparticles: A Pivotal Nexus in Vascular Homeostasis and Disease. *Curr Clin Pharmacol.* 2016;11(1):28-42.
131. Rajendran L, *et al.* Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(30):11172-7.
132. Hoshinomi A, *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015;527(7578):329-35.
133. Cosme J, Liu PP, Gramolini AO. The cardiovascular exosome: current perspectives and potential. *Proteomics.* 2013;13(10-11):1654-9.
134. Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol.* 2007;212(1):174-81.



135. Burger D, Schock S, Thompson CS. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(7):423-41.
136. Hergenreider E, *et al*. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*. 2012;14(3):249-56.
137. Martinez-Pinna R, *et al*. Label-free quantitative proteomic analysis of human plasma-derived microvesicles to find protein signatures of abdominal aortic aneurysms. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(7-8):620-5.
138. Rubinstein N, *et al*. The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*. 2004;64(1):1-12.
139. Théry C, *et al*. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166(12):7309-18.
140. van Kimmenade RR, Januzzi JLJ. Emerging biomarkers in heart failure. *Clin Chem*. 2012;58(1):127-38.
141. Shah RV, *et al*. Galectin-3, cardiac structure and function, and long-term mortality in patients with acutely decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(8):826-32.
142. Sharma UC, *et al*. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation*. 2004;110(19):3121-8.
143. Calvier L, *et al*. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(1):67-75.
144. Menini S, *et al*. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2013;100(3):472-80.
145. Stock M, *et al*. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. *J Biol Chem* 2003;278(19):17360-7.
146. Yu L, *et al*. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail*. 2013;6(1):107-17.
147. Nachtigal M, Ghaffar A, Mayer EP. Galectin-3 gene inactivation reduces atherosclerotic lesions and adventitial inflammation in ApoE-deficient mice. *Am J Pathol*. 2008;172(1):247-55.
148. Arar C, *et al*. Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1998;430(3):307-11.
149. Papatyridonos M, *et al*. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):433-40.
150. MacKinnon AC, *et al*. Inhibition of galectin-3 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Glycobiology*. 2013;23(6):654-63.
151. Calvier L, *et al*. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-induced cardiac and renal injuries. *JACC Heart Fail* 2015;3(1):59-67.

152. Ridley BL, O'Neill MA, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 2001;57(6):929-67.
153. Gunning AP, Bongaerts RJ, Morris VJ. Recognition of galactan components of pectin by galectin-3. *FASEB J*. 2009;23(2):415-24.
154. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318(Pt 1):1-14.
155. Berger T, *et al*. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1834-9.
156. Flo TH, *et al*. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-21.
157. Chakraborty S, *et al*. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-69.
158. Yan L, *et al*. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37258-65.
159. Schroll A, *et al*. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *Eur J Immunol*. 2012;42(12):3346-57.
160. Mishra J, *et al*. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-43.
161. Ramos-Mozo P, *et al*. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):552-6.
162. Folkesson M, *et al*. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):427-33.
163. Xiao Y, *et al*. Circulating lipocalin-2 and retinol-binding protein 4 are associated with intima-media thickness and subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(6):e66607.
164. Eilenberg W, *et al*. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2016;51(5):623-31.
165. Lindberg S, *et al*. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the general population: association with inflammation and prognosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):2135-42.
166. Cheng JM, *et al*. Circulating osteoglycin and NGAL/MMP9 complex concentrations predict 1-year major adverse cardiovascular events after coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(5):1078-84.
167. Joensen JB, *et al*. Can long-term antibiotic treatment prevent progression of peripheral arterial occlusive disease? A large, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis*. 2008;196(2):937-42.

168. Caligiuri G, *et al.* Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(3):618-23.
169. Madrigal-Matute J, *et al.* Thioredoxin-1/peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2015;86:352-61.
170. Liu Z, Petersen R, Devireddy L. Impaired neutrophil function in 24p3 null mice contributes to enhanced susceptibility to bacterial infections. *J Immunol*. 2013;190(9):4692-706.
171. Rong JX, *et al.* Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13531-6.
172. Kim K, Mayer EP, Nachtigal M. Galectin-3 expression in macrophages is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1641(1):13-23.
173. Liu FT, *et al.* Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*. 1995;147(4):1016-28.
174. Suzuki Y, *et al.* Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(5):924-34.
175. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(1):29-38.
176. Welton JL, *et al.* Proteomics analysis of bladder cancer exosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(6):1324-38.
177. Rautou PE, *et al.* Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res*. 2011;109(5):593-606.
178. Roman MJ, *et al.* Vascular biomarkers in the prediction of clinical cardiovascular disease: the Strong Heart Study. *Hypertension*. 2012;59(1):29-35.
179. Simon A, Megnien JL, Chironi G. The value of carotid intima-media thickness for predicting cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(2):182-5.
180. Lorenz MW, *et al.* Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2007;115(4):459-67.
181. Winter MP, *et al.* Soluble galectin-3 is associated with premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2016;46(5):386-91.
182. van Kimmenade RR, *et al.* Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(6):1217-24.
183. van der Velde AR, *et al.* Serial galectin-3 and future cardiovascular disease in the general population. *Heart*. 2016;102(14):1134-41.

184. Maiolino G, *et al.* Galectin-3 predicts long-term cardiovascular death in high-risk patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35(3):725-32.
185. Jagodzinski A, *et al.* Predictive value of galectin-3 for incident cardiovascular disease and heart failure in the population-based FINRISK 1997 cohort. *Int J Cardiol.* 2015;192:33-9.
186. Tuñón J, *et al.* Usefulness of a combination of monocyte chemoattractant protein-1, galectin-3, and N-terminal probrain natriuretic peptide to predict cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2014;113(3):434-40.
187. Tang WH, *et al.* Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival. *Am J Cardiol.* 2011;108(3):385-90.
188. de Boer RA, *et al.* The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med.* 2012;272(1):55-64.
189. Hashmi S, Al-Salam S. Galectin-3 is expressed in the myocardium very early post-myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol* 2015;24(4):213-23.
190. Michel JB, *et al.* Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):18-27.
191. Kadirvel R, *et al.* Differential expression of genes in elastase-induced saccular aneurysms with high and low aspect ratios. *Neurosurgery.* 2010;66(3):578-84; discussion 84.
192. Vergaro G, *et al.* Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol-Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice. *Hypertension.* 2016;67(3):606-12.
193. Martínez-Martínez E, *et al.* Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension.* 2015;66(4):767-75.
194. de Boer RA, *et al.* Galectin-3: a modifiable risk factor in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2014;28(3):237-46.
195. Tanweer O, *et al.* A comparative review of the hemodynamics and pathogenesis of cerebral and abdominal aortic aneurysms: lessons to learn from each other. *J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg.* 2014;16(4):335-49.
196. Sharma AK, *et al.* Experimental abdominal aortic aneurysm formation is mediated by IL-17 and attenuated by mesenchymal stem cell treatment. *Circulation.* 2012;126(11 Suppl 1):S38-45.
197. Moehle CW, *et al.* Bone marrow-derived MCP1 required for experimental aortic aneurysm formation and smooth muscle phenotypic modulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(6):1567-74.
198. Sano H, *et al.* Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000;165(4):2156-64.

199. Filer A, *et al.* Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways. *Arthritis Rheum.* 2009;60(6):1604-14.
200. Zografos T, *et al.* Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2009;104(7):917-20.
201. Sahinarslan A, *et al.* Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2011;22(5):333-8.
202. Hemdahl AL, *et al.* Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):136-42.
203. Leclercq A, *et al.* Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment. *J Leukoc Biol.* 2007;82(6):1420-9.
204. Bu DX, *et al.* Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB. *Am J Pathol.* 2006;169(6):2245-53.
205. Jacob T, *et al.* Initial steps in the unifying theory of the pathogenesis of artery aneurysms. *J Surg Res* 2001;101(1):37-43.
206. Wang G, *et al.* Up-regulated lipocalin-2 in pulmonary hypertension involving in pulmonary artery SMC resistance to apoptosis. *Int J Biol Sci.* 2014;10(7):798-806.
207. Nanashima N, *et al.* Deletion of phospholipase A2 group IVc induces apoptosis in rat mammary tumour cells by the nuclear factor- $\kappa$ B/lipocalin 2 pathway. *Biochem J.* 2015;469(2):315-24.
208. Xiong H, *et al.* Up-regulation of miR-138 inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via down-regulating lipocalin-2 expression. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(1):25-30.
209. Tong Z, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2008;68(15):6100-8.
210. Wu L, *et al.* Lipocalin-2 enhances angiogenesis in rat brain endothelial cells via reactive oxygen species and iron-dependent mechanisms. *J Neurochem.* 2015;132(6):622-8.
211. Surlin P, *et al.* Involvement of TSP1 and MMP9/NGAL in angiogenesis during orthodontic periodontal remodeling. *ScientificWorldJournal.* 2014;2014:421029.
212. Yang J, *et al.* Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer. *FASEB J* 2013;27(1):45-50.
213. Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;800:157-74.

214. Keeling WB, *et al.* An overview of matrix metalloproteinases in the pathogenesis and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg.* 2005;39(6):457-64.
215. Pearce WH, Shively VP. Abdominal aortic aneurysm as a complex multifactorial disease: interactions of polymorphisms of inflammatory genes, features of autoimmunity, and current status of MMPs. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1085:117-32.
216. Kokje VB, Hamming JF, Lindeman JH. Editor's Choice - Pharmaceutical Management of Small Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review of the Clinical Evidence. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;50(6):702-13.
217. Alsac JM, *et al.* Fucoidan interferes with *Porphyromonas gingivalis*-induced aneurysm enlargement by decreasing neutrophil activation. *J Vasc Surg.* 2013;57(3):796-805.
218. Grigoryants V, *et al.* Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2005;41(1):108-14.
219. Hannawa KK, *et al.* L-selectin-mediated neutrophil recruitment in experimental rodent aneurysm formation. *Circulation.* 2005;112(2):241-7.
220. Moore G, *et al.* Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms by systemic treatment with a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor (RS 132908). *J Vasc Surg* 1999;29(3):522-32.
221. Bigatel DA, *et al.* The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 limits expansion of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999;29(1):130-8; discussion 8-9.
222. Nosoudi N, *et al.* Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles. *Circ Res.* 2015;117(11):e80-9.
223. Sillesen H, *et al.* Randomized clinical trial of mast cell inhibition in patients with a medium-sized abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2015;102(8):894-901.
224. Meijer CA, *et al.* Doxycycline for stabilization of abdominal aortic aneurysms: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2013;159(12):815-23.
225. Bhamidipati CM, *et al.* 5-Lipoxygenase pathway in experimental abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(12):2669-78.
226. Iida Y, *et al.* Peptide inhibitor of CXCL4-CCL5 heterodimer formation, MKEY, inhibits experimental aortic aneurysm initiation and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(4):718-26.
227. Johnston WF, *et al.* Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1 $\beta$  signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):294-304.

## ANEXO

---





Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados parcialmente en:

- Madrigal-Matute J\*, Lindholt JS\*, **Fernandez-Garcia CE\***, Benito-Martin A, Burillo E, Zalba G, Beloqui O, Llamas-Granda P, Ortiz A, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *Galectin-3, a biomarker linking oxidative stress and inflammation with the clinical outcomes of patients with atherothrombosis*. J Am Heart Assoc. 2014 Aug 5;3(4). pii: e000785. \*: Primer autor.
- Tarín C, **Fernandez-Garcia CE**, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejón B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL. *Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice*. Cardiovasc Res. 2016 Aug 1;111(3):262-73.
- **Fernandez-Garcia CE**, Tarin C, Martinez-Lopez D, Lindholt JS, Vega de Ceniga M, Egido J, Lopez-Andres N, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *Galectin-3 is upregulated in human and experimental abdominal aortic aneurysm*. Clin Sci (Lond). (ENVIADO)

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- **Fernandez-García CE**, Burillo E, Lindholt JS, Martinez-Lopez D, Pilely K, Mazzeo C, Michel JB, Egido J, Garred P, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *Association of Ficolin-3 with abdominal aortic aneurysm presence and progression*. J. Thromb. Haemost. 2016 Dec 31. doi: 10.1111/jth.13608.
- Beneit N, **Fernández-García CE**, Martín-Ventura JL, Perdomo L, Escribano Ó, Michel JB, García-Gómez G, Fernández S, Díaz-Castroverde S, Egido J, Gómez-Hernández A, Benito M. *Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis*. Cardiovasc Diabetol. 2016 Dec 1;15(1):161.

- Burillo E, Tarin C, Torres-Fonseca MM, **Fernandez-García CE**, Martinez-Pinna R, Martinez-Lopez D, Llamas-Granda P, Camafeita E, Lopez JA, Vega de Ceniga M, Aviram M, Egido J, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL. *Paraoxonase-1 overexpression prevents experimental abdominal aortic aneurysm progression*. Clin Sci (Lond). 2016 Jun 1;130(12):1027-38.
- Madrigal-Matute J, **Fernandez-Garcia CE**, Blanco-Colio LM, Burillo E, Fortuño A, Martinez-Pinna R, Llamas-Granda P, Beloqui O, Egido J, Zalba G, Martin-Ventura JL. *Thioredoxin-1/peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis*. Free Radic Biol Med. 2015 Sep;86:352-61.
- Martin-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Blanco-Colio LM, Moreno JA, Tarin C, Burillo E, **Fernandez-Garcia CE**, Egido J, Meilhac O, Michel JB. *Erythrocytes, leukocytes and platelets as a source of oxidative stress in chronic vascular diseases: detoxifying mechanisms and potential therapeutic options*. Thromb Haemost. 2012 Sep;108(3):435-42.
- Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, **Fernandez-Garcia CE**, Ramos-Mozo P, Burillo E, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *Cell stress proteins in atherothrombosis*. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:232464.
- Madrigal-Matute J, **Fernandez-Garcia CE**, Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Muñoz-Garcia B, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. *HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis*. Cardiovasc Res. 2012 Jul 1;95(1):116-23.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentado en las siguientes reuniones científicas:

- **American Heart Association Scientific Sessions 2016**

**Título:** Exosomes and atherosclerosis

**Autores:** Carlos Ernesto Fernández García, Julio Madrigal Matute, Jes S. Lindholt, Elena Burillo, José Luis Martín Ventura, Roxana Martínez Pinna, Patricia Llamas Granda, Alberto Benito, Diego Martínez López, Luis Blanco Colio, Guillermo Zalba, Óscar Beloqui, Alberto Ortiz, Jesús Egido, Peter Garred, Katrine Pilely, Jean-Baptiste Michel.

**Participación:** Seminario, ponente

**Lugar y fecha:** New Orleans, Noviembre 2016

- **XXVII Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis**

**Título:** Galectin-3, a biomarker linking oxidative stress and inflammation with the clinical outcomes of patients with atherothrombosis

**Autores:** Madrigal-Matute J, Lindholt JS, **Fernandez-Garcia CE**, Benito-Martin A, Burillo E, Zalba G, Beloqui O, Llamas-Granda P, Ortiz A, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL

**Participación:** Póster

**Lugar y fecha:** Barcelona, 2014

Otros resultados presentados en reuniones científicas durante la tesis:

- **XXIX Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis**

**Título:** Association of Ficolin-3 with abdominal aortic aneurysm presence and progression

**Autores:** Fernandez-García CE, Burillo E, Lindholt JS, Martinez-Lopez D, Pilely K, Mazzeo C, Michel JB, Egido J, Garred P, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL.

**Participación:** Póster.

**Lugar y fecha:** Granada, Mayo 2016

- **XXIX Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis**

**Título:** Thioredoxin/Peroxiredoxin-1 release to the extracellular medium is mediated by exosomes in response to oxidative stress

**Autores:** Fernandez-García CE, Burillo E, Lindholt JS, Martinez-Lopez D, Pilely K, Mazzeo C, Michel JB, Egido J, Garred P, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL.

**Participación:** Ponente.

**Lugar y fecha:** Segovia, Septiembre 2012

## ABREVIATURAS

---



Relación de abreviaturas y acrónimos empleados (por orden de aparición):

AAA	Aneurisma de aorta abdominal
ABI	Índice tobillo-brazo
AngII	Angiotensina II
ApoE	Apolipoproteína E
AUC	Área bajo la curva
BCA	Ácido bicinconánico
BMI	Índice de masa corporal
BSA	Albúmina de suero bovino
CI	Intervalos de confianza
CMLV	Células de músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenasa
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CRP	Proteína C reactiva
Cy3	Cianina 3
DAB	3,3'-diaminobencidina
DBP	Presión arterial diastólica

DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECM	Matriz extracelular
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	<u>Ácido etilendiaminotetraacético</u>
EGTA	<i>Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ESCRT I	<i>Endosomal sorting complex required for transport I</i>
FBS	Suero fetal bovino
FMT	Tomografía molecular fluorescente
FPR2/ALX	<i>N-formyl peptide receptor</i>
Gal	Galectina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HF	Insuficiencia cardíaca
HRP	Peroxidasa de rábano
HR	Riesgo relativo
HTN	Hipertensión arterial
ICD	Clasificación Internacional de Enfermedades



IgG	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
ILT	Trombo intraluminal
IMT	Grosor íntima-media
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLr <sup>-/-</sup>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LP-PLA2	Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas
MCP	<i>Modified citrus pectin</i>
MMP	Metaloproteinasa
NAD(P)H	Nicotín adenín dinucleótido (fosfato) oxidasa
NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos
NP-40	Nonil fenoxipolietoxietanol 40
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
OCT	<i>Optimum cutting temperatura</i>
PAD	Enfermedad arterial periférica
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PLA2	Fosfolipasa A2
PMA	Forbol miristato acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBP	Presión arterial sistólica
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error Estadístico Medio
SN	Sobrenadante
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	Tampón Tris-salino
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
WT	<i>Wild type</i>

