



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

**“Paper de la via de la PGE<sub>2</sub> en la  
hipervascularització associada a l’aneurisma  
aòrtic abdominal”**

Realitzada pel doctorant:

**David Solà Villà**

**DIRECTOR DE LA TESI DOCTORAL:**

**Dr. Luís Vila Navarro**

**TUTOR DE LA TESI DOCTORAL:**

**Dr. Jorge Ordóñez Llanos**

**Departament de Bioquímica i Biologia Molecular**

**Universitat Autònoma de Barcelona, 2015**



**“Paper de la via de la PGE<sub>2</sub> en la  
hipervascularització associada a l’aneurisma  
aòrtic abdominal”**

**David Solà Villà**



*“Aquesta tesi la dedico amb molta, molta, molta il.lusió al meu pare, no només pel simple fet que m’ha ajudat en la correcció lingüística de tot el text, recolzat en els bons i mals moments i viscut la tesi amb devoció i dedicació, sinó que sé que ha viscut molt satisfactòriament la meva decisió d’acabar aquesta feina que feia masses anys que havia quedat pendent”.*

“Han estat 20.000 llegües de viatge submarí. Ara, ja pots sortir a la superfície”



## **FINANÇAMENT**

Aquesta Tesi Doctoral ha estat finançada parcialment per:

- *Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica*, Projecte SAF2010-21392.
- *Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica*, Projecte SAF2013-46707-R.
- Per les RETICs de l'Institut Salud Carlos III, RECAVA, encarregada dels factors de risc, evolució i tractament de les malalties cardiovasculars i els seus mecanismes (Exp RD06/0014/1005) i RIC: Red Investigación Cardiovascular (Exp RD12/0042/0051).

## **CONFLICTES D'INTERÈS**

L'autor d'aquesta tesi doctoral i els seus directors expressen que no hi ha hagut cap conflicte d'interès directe o indirecte durant la realització de la mateixa.





## **AGRAÏMENTS:**

Lluís Vila, gràcies per la teva enorme dedicació, paciència i generositat que has demostrat al llarg de tots aquests anys. Tot i que encara no s'ha acabat tot el periple i potser algun esgarip o altre més em mereixeré, penso que la voluntat d'ajudar-me que has tingut és digne d'una gran persona. Independentment, he pogut comprovar que ets un gran científic i investigador, fet que m'ha permès aprendre moltes més coses professionals i personals de les que t'imagines. Encara que no t'ho creguis! Moltíssimes gràcies, Lluís!!

Molt agraït a tot l'equip del laboratori Sònia, Laura i Mercedes per tota la feina feta. Heu estat el motor de tots aquests resultats, sou unes autèntiques *cracks*!

Molt content d'haver rebut mils d'ajuts, més aviat morals que no pas científics, és clar, de tota aquella gent que m'estima i ha estat al meu costat durant tots aquests anys: Txell, mare, àvia, Marta i Ton.

No puc deixar d'agrair a tots aquells del món de la faràndula que en certa manera han estat al meu costat dins i fora de l'escenari acusant-me de ser el metge de la família pel sol fet de ser doctor, Àfrica, Rafa i Josep. Nois, ser doctor no vol dir ser metge! Als llargs "cafès" amb el meu gran amic Vladi, que no és doctor però sí un gran apuntador. Han sigut reconfortants i plens d'energia, i positiva!

La música de fons de Jamie Cullum ha estat omnipresent durant tot el llarg procés de clausura-escritura i en algun moment, fins i tot, ha arribat a desviar el meu interès per la ciència cap al jazz. Sembla mentida, tu! *Thank you so much, Jamie!*

Content de tenir un tiet com el Ricard Solà que en bona part és el culpable de tota la meva experiència en el món de la investigació. Moltes gràcies, tiet! Allò que va començar amb un ronyó de rata ha acabat amb una aorta humana, però ha acabat que és l'important!

## RESUM

L'Aneurisma Aòrtic Abdominal (AAA) és una malaltia vascular que afecta amb rellevància la població dels països industrialitzats. És una malaltia que té pocs símptomes i en cas de ruptura de l'artèria aorta té una taxa de mortalitat molt alta per dessagnació interna. Les principals característiques d'aquesta alteració vascular són la dilatació de les parets del vas aòrtic com a conseqüència de la degradació de les diferents capes del mur vascular i una hipervascularització de l'artèria. Aquests dos processos estan estretament relacionats amb el procés inflamatori que es desenvolupa a la paret de l'artèria.

Hem investigat la via de la PGE<sub>2</sub> en l'AAA i la seva relació amb la hipervascularització associada a aquesta malaltia. Hem analitzat mostres de pacients d'AAA sotmesos a intervenció quirúrgica i les hem comparat amb les mostres de donants multiorgànics. Els pacients havien estat estratificats en funció del diàmetre màxim de l'aorta: *low diameter* (LD) (>55mm), *moderate diameter* (MD) (55-69,9mm), i *high diameter* (HD) (≥70mm).

L'AAA es caracteritza per una abundant microvasculatura en la capa mitjana i adventícia amb una infiltració perivascular de cèl·lules CD45 positives. Els nivells d'mRNA de la ciclooxigenasa (COX)-2 i de la isoforma microsomal de la prostaglandin E sintasa (mPGES-1) estan incrementats en les mostres d'AAA (4,4 i 1,4 vegades respectivament). Els dos enzims estan localitzats en les cèl·lules endotelials (EC), en les cèl·lules vasculars llises (VSMC) i en els leucòcits. Aquests enzims, així com els marcadors d'EC, tenen una expressió màxima en el grup LD de pacients d'AAA, mentre que l'expressió dels marcadors de leucòcits mostren un màxim en el grup MD de pacients d'AAA.

Aquests resultats indiquen que la hipervascularització i la *up-regulation* de la COX-2/mPGES-1 precedeixen al màxim d'infiltració leucocitària.

Els nivells de metabòlits de PGE<sub>2</sub> circulants i secretats pel teixit d'aneurisma *in vitro* són més alts en les mostres d'AAA que no pas en les mostres control (plasma-controls, 19.9±2.2 pg/ml; plasma-AAA, 38,8±5,5 pg/ml; teixit aòrtic-control 16,5±6,4 pg/mg; teixit aòrtic-AAA, 72,9±6,4 pg/mg).

Els receptors de la PGE<sub>2</sub> EP2 i EP4 estan sobreexpressats en les mostres d'AAA, sent el receptor EP4 l'únic receptor substancialment expressat en les cèl·lules endotelials i colocalitzat amb l'mPGES-1 en la microvasculatura. A més, el receptor EP4 media l'angiogènesi *in vitro* activada per la PGE<sub>2</sub>.

Amb aquest estudi aportem *de novo* dades de l'expressió de l'mPGES-1 en mostres d'AAA humanes. Tots els nostres resultats suggereixen que l'eix COX-2/mPGES-1/EP4 en la microvasculatura pot tenir una especial rellevància en la hipervascularització associada a l'AAA.

## **SUMARI**

### 1. ABREVIATURES

### 2. INTRODUCCIÓ

2.1 ANEURISMA AÒRTIC ABDOMINAL (AAA)

2.2 PROCÉS INFLAMATORI ASSOCIAT A L'AAA

2.3 ELS ICOSANOIDES: PROSTANOIDES I LEUCOTRIENS

2.4 BIOSÍNTESI I ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PROSTANOIDES

PRINCIPALS: TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>

2.5 INACTIVACIÓ DE LA PGE<sub>2</sub>

2.6 ELS LEUCOTRIENS

2.7 RELLEVÀNCIA DE LA VIA DE LA PGE<sub>2</sub> EN LA PATOGÈNESI DE

L'AAA

2.8 L'mPGES-1 COM A DIANA ALTERNATIVA ALS INHIBIDORS

SELECTIUS DE LA COX-2

### 3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

### 4. MATERIAL I MÈTODES

4.1 OBTENCIÓ DE TEIXIT D'AORTA (AAA I NA)

4.2 ANÀLISI DEL NIVELL D'EXPRESSIÓ DE L'RNA MISSATGER EN

TEIXIT D'AORTA

4.2.1 EXTRACCIÓ DE L'RNA TOTAL

4.2.2 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I PURESA DE

L'RNA

4.2.3 TRANSCRIPCIÓ REVERSA I PCR A TEMPS REAL

4.3 ANÀLISI DELS PROSTANOIDES PLASMÀTICS I ELS ALLIBERATS

PEL TEIXIT AÒRTIC EN CULTIU

4.3.1 OBTENCIÓ DE SECRETOMES

4.3.2 OBTENCIÓ DE PLASMA

4.3.3 ANÀLISI D'ICOSANOIDES

4.4 IMMUNOHISTOQUÍMICA

4.5 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

4.6 CULTIUS CEL·LULARS

4.6.1 CULTIU DE CÈL·LULES ENDOTELIALS DE VENA DE  
CORDÓ UMBILICAL HUMÀ (HUVEC)

4.6.2 CULTIU DE FIBROBLASTS HUMANS

4.6.3 CULTIU DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES VASCULARS  
HUMANES (VSMC)

4.6.4 CULTIU DE CÈL·LULES ENDOTELIALS DE  
MICROVASCULATURA HUMANES (MVEC)

4.7 ANÀLISI DEL NIVELL D'EXPRESSIÓ DE L'RNA MISSATGER EN  
CÈL·LULES EN CULTIU

4.7.1 EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL DE CÈL·LULES EN CULTIU

4.8 IMMUNOCITOQUÍMICA

4.9 ANÀLISI *IN VITRO* DE L'ANGIOGÈNESI

4.10 ANÀLISI ESTADÍSTICA

4.11 ESTRATIFICACIÓ DELS PACIENTS EN FUNCIÓ DEL DIÀMETRE  
DE L'AORTA

5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.1 ANÀLISI DEL METABOLISME DE LA PGE<sub>2</sub> EN TEIXIT AÒRTIC

- 5.1.1 NIVELLS D'mRNA DE LA COX-1 I DE LA COX-2 EN MOSTRES DE NA I D'AAA. EXPRESSIÓ DELS ISOENZIMS DE LA COX
- 5.1.2 LOCALITZACIÓ DE LA COX-2. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE LA COX-2
- 5.1.3 EXPRESSIÓ DE L'mPGES-1 EN MOSTRES NA I D'AAA
- 5.1.4 LOCALITZACIÓ DE L'mPGES-1. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE L'mPGES-1
- 5.1.5 METABOLISME DE LA PGE<sub>2</sub>. EXPRESSIÓ DE LA 15-PGDH
- 5.1.6 EXPRESSIÓ DEL MARCADOR DE LEUCÒCITS CD45
- 5.2 ESTUDI DELS RECEPTORS DE LA PGE<sub>2</sub> EN TEIXIT AÒRTIC
  - 5.2.1 EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS DE LA PGE<sub>2</sub> EN MOSTRES NA I D'AAA
  - 5.2.2 NIVELLS D'mRNA DELS DIFERENTS RECEPTORS EPs EN CÈL·LULES VASCULARS EN CULTIU
  - 5.2.3 LOCALITZACIÓ DELS EPs EN LES MOSTRES D'AORTA
- 5.3 ANÀLISI DE LA VASCULARITZACIÓ EN L'AAA
  - 5.3.1 IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND COM A MARCADOR DE CÈL·LULES ENDOTELIALS EN MOSTRES DE NA I D'AAA
  - 5.3.2 IMMUNOHISTOQUÍMICA DE CD45 I CD68 COM A MARCADORS D'INFILTRACIÓ LEUCOCITÀRIA I MACRÒFAGS EN MOSTRES D'AAA
  - 5.3.3 NIVELLS D'mRNA DE MARCADORS DE CÈL·LULES ENDOTELIALS EN MOSTRES DE NA I D'AAA



5.4 DESENVOLUPAMENT DE L'AAA. SÍNTESI I EFECTE DE LA PGE<sub>2</sub>  
EN LES CÈL·LULES DEL PARÈNQUIMA DE TEIXIT AÒRTIC

5.4.1 NIVELLS D'mRNA DE MARCADORS DE LEUCÒCITS EN  
MOSTRES NA I D'AAA

5.4.2 CORRELACIÓ DELS MARCADORS D'EC I MARCADORS DE  
LEUCÒCITS EN ELS DIFERENTS ESTADIS DE LA MALALTIA

5.4.3 NIVELLS PLASMÀTICS DE METABÒLITS DE LA PGE<sub>2</sub> I  
EXPRESSIÓ DELS ENZIMS DE LA BIOSÍNTESI DE LA PGE<sub>2</sub>  
EN MOSTRES D'AAA ESTRATIFICATEDES EN FUNCIÓ DEL  
DIÀMETRE DE L'AORTA

5.5 ACOBLAMENT FUNCIONAL DELS ENZIMS BIOSINTÈTICS DE LA  
PGE<sub>2</sub> AMB EL RECEPTOR EP4 EN LES CÈL·LULES ENDOTELIALS

5.6 ESTUDI DE L'ANGIOGÈNESI *IN VITRO* EN RESPOSTA A LA PGE<sub>2</sub>  
EN CULTIUS DE MVEC

5.7 DISCUSSIÓ FINAL

6. CONCLUSIONS

7. BIBLIOGRAFIA

8. PUBLICACIONS

## **1. ABREVIATURES**

**AA** - Àcid Araquidònic

**AAA** - Aneurisma Aòrtic Abdominal

**AC** - Adenilat Ciclasa

**Ac** - anticòs

**AMPc** - Adenosine Monophosphate cyclic

**bFGF** - basic fibroblast growth factor

**BLT** - Receptor del Leucotriè B<sub>4</sub>

**COX** - Ciclooxygenasa

**COX-1** - Ciclooxygenasa-1

**COX-2** - Ciclooxygenasa-2

**cPGES** - citosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase

**DiHETE** - diHydroxyeicosatetraenoic

**DP** - Receptor Prostaglandina D<sub>2</sub>

**EC** - Endothelial Cell

**EIA** - Enzyme immuno assay

**eNOS** - endothelial Oxide Nitric Synthase

**EP<sub>1-4</sub>** - Receptors de la PGE<sub>2</sub>

**FLAP** - Arachinodate 5 -lipoxygenase-activating protein

**FP** - Receptor de la Prostaglandina  $2\alpha$

**GPCR** - G protein-coupled receptor

**GRO $\alpha$**  - *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

**GSH** - Glutathione

**HETE** - Hydroxyeicosatetraenoic

**h-PGDS** - hematopoiètic PGD<sub>2</sub> Sintasa

**HUVEC** - Human Umbilical Vein Endothelial Cell

**IL** - Interleuquina

**INF $\gamma$**  - Interferó  $\gamma$

**IP** - Receptor de la Prostaciclina

**I-PGDS** - lipocalin-PGD<sub>2</sub>Sintasa

**LOX** - Lipoxigenasa

**LTB<sub>4</sub>** - Leucotriè B<sub>4</sub>

**MAPEG** - membrane-associated-proteins-eicosanoids-glutathione

**MAPK** - Mitogen-activated protein kinase

**MCP-1** - Monocyte Chemotactic Protein-1

**MEC** - Matriu Extracel·lular

**mGST**- microsomalglutathioneS-transferase

**MIP** - Macrophage Inflammatory Proteins

**MMPs** - Matrixmetaloproteinases

**mPGmPGES-1** - microsomal Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase 1

**mPGES-2** - membrane Prostaglandin E<sub>2</sub> synthase 2

**MVEC** - Microvascular Endothelial Cells

**NA** - Normal Aorta

**NSAIDs** - Non-steroidal anti-inflammatory drugs

**RT-PCR** - Real Time Polimerase Chain Reaction

**PBS** - Phosphate-Buffered Saline

**PECAM-1** - platelet endothelial cell adhesion molecule-1

**15-PGDH** - 15-Prostaglandin dehydrogenase

**PG** – Prostaglandina

**PGES** – Prostaglandina E<sub>2</sub> Sintasa

**PGFS** - Prostaglandina F Sintasa

**PGIS** - Prostaglandina I<sub>2</sub> sintasa/Prostaciclina Sintasa

**PGFS** - Prostaglandina F<sub>2α</sub> Sintasa

**PK** - Protein Kinase

**PL** - Phospholipase

**PMN** - Polimorfonuclear

**PPAR** - Peroxisomeproliferator-actived receptor

**RE** - Reticle Endoplastmàtic

**RhoA** - GTPase

**TGFβ** - Transforming Growth Factor β

**TIMP** - Tissue Inhibitor Metalloproteinase

**TP** - Receptor del TXA<sub>2</sub>

**TX** - Tromboxà

**TXAS** - Tromboxà A<sub>2</sub> sintasa

**UA** - Unitat d'Absorvència

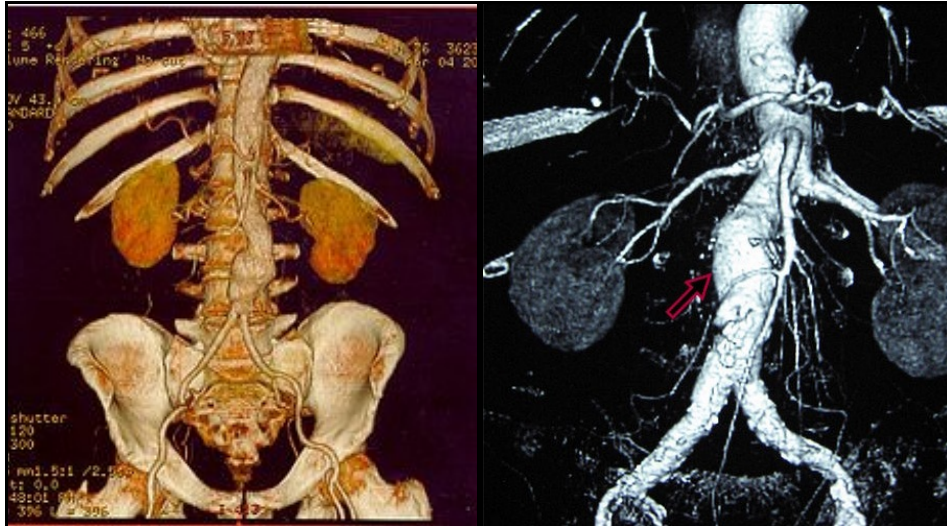
**VEGF** - Vascular Endothelial Growth Factor

**VSMC** - Vascular Smooth Muscle Cells

## 2. INTRODUCCIÓ

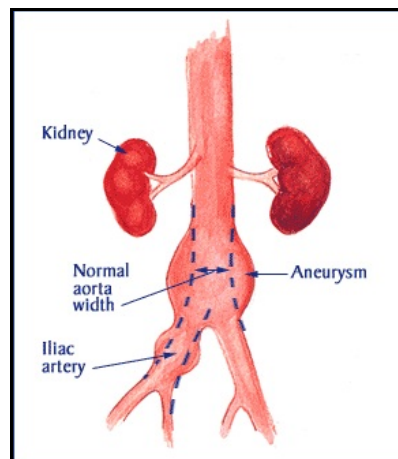
### 2.1 ANEURISMA AÒRTIC ABDOMINAL (AAA)

L'artèria aorta és la més afectada per la patologia aneurismàtica. El seu diàmetre de mitjana és de 1.9 cm en dones i 2.3 cm en homes a la zona infrarenal i lleugerament superior en la zona suprarenal. Té la funció d'irrigar tots els òrgans de la cavitat abdominal, la pelvis i les dues extremitats inferiors. La paret vascular està formada per tres capes. La capa íntima, que és la més interna i prima, està composta per cèl·lules endotelials (EC), una capa subendotelial de teixit conjuntiu i una capa interna elàstica. La capa mitjana formada principalment per cèl·lules musculars llises (VSMC) i matriu extracel·lular (MEC). I una capa adventícia que és la més externa, formada bàsicament per teixit connectiu, que engloba els *vasa vasorum* i la innervació del vas. L'AAA es defineix com aquella dilatació localitzada, progressiva i permanent de l'aorta subdiafragmàtica que sigui en el seu diàmetre transversal màxim, igual o superior al 50% del seu diàmetre normal [1], és a dir 1.5 vegades major que el diàmetre aòrtic normal esperat. Com que en pacients majors de 50 anys es consideren normals uns diàmetres de l'artèria abdominal entre 14-21 mm per les dones i 16-24 mm pels homes, també s'accepta la definició de l'AAA infrarenal com aquella dilatació que sigui major de 3 cm en diàmetre transversal [2]. A la Figura 1 podem veure dues imatges on s'evidencia un engruïment del diàmetre exterior de l'artèria aorta infrarenal.



**Figura 1.** *Imatges de la ubicació de l'aneurisma abdominal infrarenal.*

L'aneurisma també es pot estendre cap a les artèries ilíacques a l'alçada de la pelvis. La Figura 2 ens mostra un esquema on es representa un engruïment de l'artèria aorta infrarenal i de l'artèria ilíaca dreta.



**Figura 2.** *Esquema d'aneurisma infrarenal i de l'artèria ilíaca dreta.*

Es considera acceptable afirmar que aquesta patologia afecta entre el 3 i el 8.9% de la població adulta masculina (majors de 50 anys), afectant en menor mesura, (1-2.2%) a la població femenina adulta en estudis de població [3]. L'aneurisma és més freqüent a la zona infrarenal.

L'AAA és una patologia greu per diferents factors. Perquè l'artèria afectada és la de major diàmetre de l'organisme amb totes les complicacions que es produeixen en la seva ruptura i perquè és clínicament silenciosa de manera habitual. És una malaltia que rarament desenvolupa símptomes clars i previs a la ruptura. Tot i així, podem parlar com símptomes l'augment palpable de la massa abdominal i els dolors a l'abdomen, al pit i a l'esquena deguts a la pressió sobre els teixits del voltant. El dolor també pot arribar a les cames si l'aneurisma produeix una interrupció de la irrigació sanguínia.

Classifiquem els aneurismes segons les seves morfologia, localització, etiologia i estructura:

1. Morfologia: poden ser fusiformes (o saculars), els més comuns (90%) i lobulats (10%).
2. Localització: els aneurismes poden afectar l'aorta toràcica (ascendent i descendent), abdominal (visceral, suprarenal, juxtarenal o infrarenal), o formes mixtes per combinació de les anteriors (aneurismes toracoabdominals).
3. Etiologia: els aneurismes més freqüents són atribuïts a un procés degeneratiu de tipus arterioscleròtic i en un segon lloc deguts a processos infecciosos de la paret aòrtica.

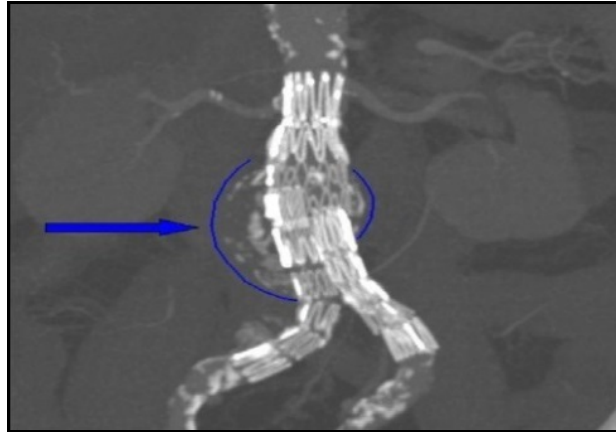
Els AAA inflamatoris són difícils de classificar, representen el 4-5% dels AAA i són d'etiologia desconeguda [4-6]. L'etiologia d'aquesta malaltia és complexa i contribueixen al seu desenvolupament factors ambientals i genètics [7-9]. Les causes concretes que desenvolupen l'aneurisma no estan del tot clares. Hi ha, però, algunes hipòtesis [9]:



1. Fumar: més del 90% de pacients amb AAA han fumat en algun moment de la seva vida. El tabaquisme constitueix un factor de risc particularment rellevant en l'AAA [10].
2. Aterosclerosi: és una malaltia inflamatòria que pot originar el procés de formació de l'aneurisma. Explicaria el deteriorament de la paret del vas al llarg de l'AAA, però no dóna explicació de per què s'inicia l'AAA. Tot i compartir algunes característiques, hi ha diferències evidents entre l'aterosclerosi i l'AAA. Mentre que les plaques d'aterosclerosi estan caracteritzades per una infiltració leucocitària des del lumen del vas cap a la capa íntima i el subendoteli i per una hiperproliferació de les cèl·lules musculars llises (VSMC) que causen una hiperplàsia de la capa mitjana del vas, l'AAA es caracteritza per una infiltració leucocitària des de la capa adventícia del vas, una pèrdua de les VSMC de la capa mitjana del vas i una hipervascularització del teixit aòrtic [11-13]. També hi ha diferències en els factors de risc entre l'AAA i l'aterosclerosi. Per exemple, mentre que la diabetis està ben caracteritzada com a un factor de risc per a l'aterosclerosi, està documentat que és un factor protector per a l'AAA [10].
3. Determinants genètics: S'ha demostrat que els factors genètics juguen un paper important en el desenvolupament de l'AAA [9].
4. Altres causes: infecció, trauma, artritis, necrosi cística.

Tot aquest procés mecànic de l'aneurisma es veu afavorit en pacients amb hipertensió arterial, encara que no es pot considerar causa de desenvolupament de l'AAA.

La cirurgia convencional o endovascular és recomanada quan l'aneurisma supera els 5.5 cm de diàmetre exterior (Figura 3), ja que el risc de mortalitat de la cirurgia és del 1-6% (depenent de l'edat del pacient), molt menor que el de ruptura.



**Figura 3.** *Ecografia del resultat de la intervenció quirúrgica on es veuen les parets de l'artèria reforçades per evitar la ruptura.*

## 2.2 PROCÉS INFLAMATORI ASSOCIAT A L'AAA

Les característiques principals de l'AAA són la inflamació de la paret de l'aorta, la degradació proteolítica de les fibres elàstiques, la disminució de les VSMC i la hipervascularització del teixit aòrtic. A més, tots aquests processos juguen un paper determinant en l'evolució i el desenvolupament de la patologia.

Hi ha força evidències que involucren les cèl·lules del sistema immunològic i els seus mediadors en la formació i el desenvolupament de l'aneurisma. En models animals i en mostres de teixit humà d'aneurisma, s'ha vist que cèl·lules del sistema immunitari, com leucòcits polimorfonuclears (PMN), macròfags i limfòcits T [14], estan relacionades amb la formació de l'AAA.

Hi ha dos processos bioquímics i cel·lulars implicats en la dilatació aneurismàtica i la seva posterior ruptura: proteòlisi de la MEC de la paret vascular i l'apoptosi de les VSMC [15]. En els dos processos les proteases juguen un paper central perquè causen la degradació de la MEC i indueixen anoïkis en les VSMC [16-18].

La proteòlisi de la MEC és un fet característic dels AAA que comporta la destrucció de les fibres elàstiques de la capa mitjana. Aquestes fibres elàstiques són el principal component estructural de les grans artèries, de manera que s'ha de suposar que es produeix una pèrdua de la seva resistència mecànica que n'afavoreix la ruptura. Aquestes fibres elàstiques estan compostes bàsicament d'elastina [19] i és per aquest motiu les elastases han estat estudiades en la formació de l'AAA [20,21]. A més, la capa mitjana, responsable en bona part de la nutrició del teixit, en quedar danyada, deixa el teixit del vas susceptible de patir danys.

Es produeix una retroalimentació i sinèrgies on durant les quals es degrada la MEC i al mateix temps aquesta degradació afavoreix la pròpia neovascularització que facilita la formació de nous agregats inflamatoris locals. El procés de ruptura del vas s'origina en la capa mitjana on l'activitat metal·loproteïnasa està incrementada. Es podria descriure com un procés de renovació descompensada de la MEC, de manera que predomina la degradació del teixit per la síntesi de la MEC.

Concretament, les proteases involucrades en aquest procés són les metal·loproteïnases de la matriu, les MMP i els seus inhibidors fisiològics TIMP (*Tissue Inhibitor Metalloproteinase*), -1, -2, -3. Les MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -12

i -13 són les més significatives, especialment la MMP-2 i la MMP-9. En aneurismes també s'han trobat concentracions força elevades de serina proteases i cisteïna proteases, de manera que podrien estar molt relacionades amb el procés de degradació de la paret vascular [14,20-23]. Les VSMC produeixen proteases i els seus inhibidors, de manera que la interacció entre els leucòcits (PMN, macròfags) i les cèl·lules del mur vascular és crucial pel transcurs d'aquest procés de degradació [14,24,25].

Històricament, la ruptura del vas com a conseqüència de l'aneurisma s'ha atribuït a un simple procés biomecànic que s'esdevé en el moment en què l'estrès del mur vascular fa que aquest no pugui suportar la força de tensió a què es veu sotmès. Actualment, la ruptura del vas s'atribueix a l'acció conjunta de processos bioquímics i biomecànics. A més s'ha observat que el trombe intraluminal que s'acumula al llarg del lumen també afecta el desenvolupament de l'AAA [26].

La destrucció de la MEC de la capa mitjana del vas aòrtic provoca que les VSMC es desenganxin de la MEC i es morin (procés anomenat anoïkis), la qual cosa afavoreix encara més la debilitació de la paret vascular [13,16].

Els infiltrats inflamatoris i els neovasos infiltrants produïts a través de l'angiogènesi són una font rellevant de MMPs en la paret de l'AAA i poden contribuir de manera essencial a la inestabilitat de la paret aneurismàtica [11,27,28]. Per tant, el procés de neovascularització és un fenomen estretament lligat al procés d'aneurisma [12]. Està regulat, entre d'altres, per factors pro-angiogènics com quimioquines, pel factor vascular de creixement

endotelial (VEGF), per la interleuquina-8 (IL-8), per la proteïna quimiotàctil per monòcits (MCP-1) i pels prostanoides.

L'autoimmunitat sembla jugar un paper important en l'AAA [29]. Aquest fet fa que es pugui pensar en la utilització de fàrmacs immunomoduladors i antiinflamatoris per reduir el procés inflamatori i així aturar el creixement dels aneurismes.

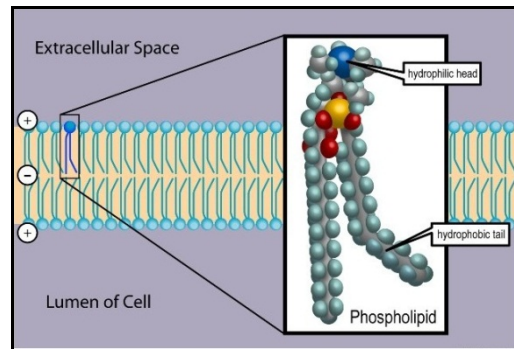
### 2.3 ELS ICOSANOIDES: PROSTANOIDES I LEUCOTRIENS

El nostre estudi està enfocat a determinar el paper de la prostagladina (PG) E<sub>2</sub> que forma part d'una sèrie de productes resultants del metabolisme de l'Àcid Araquidònic (AA), els icosanoides.

Els icosanoides estan relacionats entre d'altres amb els processos inflamatoris.

Els icosanoides són derivats d'àcids grassos poliinsaturats de 20 carbonis sent el més notori l'AA. Estan implicats en diferents processos biològics com la inflamació, la febre, la trombosi, les respostes al·lèrgiques i immunes i el càncer, entre d'altres.

Trobem generalment l'AA en els fosfolípids de membrana cel·lular dels mamífers (Figura 4) i és alliberat per l'acció de les fosfolipases (PLs) que hidrolitzen els enllaços èster alliberant àcids grassos lliures.



**Figura 4.** Ubicació i estructura molecular dels fosfolípids dins la membrana cel·lular.

Un subgrup dels icosanoides són els prostanoides que inclouen les Prostaglandines (PG) i Tromboxans (TX). En la biosíntesi dels prostanoides els àcids grassos poliinsaturats alliberats per les PLs són oxidats a endoperòxids per l'acció de la ciclooxigenasa (COX). La PGH<sub>2</sub> és l'endoperòxid intermediari comú en la síntesi de prostanoides derivats de l'AA (Figura 5). La conversió de l'AA en PGH<sub>2</sub> és una reacció catalitzada per la COX en dos passos (ciclooxigenasa pròpiament dita i peroxidasa) que es produeixen en dos centres actius de l'enzim que estan acoblats. L'activitat peroxidasa genera un radical tyrosyl que extreu un àtom d'hidrogen del carboni 13 de l'AA. El centre ciclooxigenasa utilitza el grup ferro-heme per la catàlisi i incorpora una molècula d'O<sub>2</sub> als carbonis 11- i 15- de l'AA per formar la PGG<sub>2</sub>. L'anell de 5 carbonis es tanca entre els C-8 i C-12 i el pont endoperòxid, entre els C-9 i C-11. Finalment es forma un grup peròxid al C-15. Posteriorment l'activitat peroxidasa redueix el grup peròxid a hidroxil per formar la PGH<sub>2</sub>. Aquesta PG és força inestable degut a la seva estructura i es transformarà en les diferents PGs per acció enzimàtica de les PGsintases. En general aquest procés és específic de tipus cel·lular, diferents cèl·lules produeixen majoritàriament

només un dels prostanoides. L'activitat COX és un enzim que s'inactiva després de 300 cicles catalítics [30].

Fins ara es coneixen en humans dos isoenzims de la COX [30]: COX-1 i COX-2. Diferents teixits expressen diferents nivells de COX-1 i COX-2. Ambdós enzims tenen una similitud de seqüència d'aminoàcids del 60%, uns centres actius gairebé idèntics i es localitzen en els cromosomes 9 i 1 respectivament. La diferència més rellevant és la substitució d'isoleucina en la posició 523 de la COX-1 per valina en la COX-2, la qual ens permetrà inhibir selectivament un enzim o l'altre. La Val<sub>523</sub>, en ser un residu més petit, permet l'entrada d'inhibidors al centre actiu hidrofòbic inhibint específicament la COX-2, mentre que la Iso<sub>523</sub> en dificulta l'entrada [31].

La COX-1 (70 KDa) és considerada un enzim constitutiu. La seva expressió sembla estar regulada pel grau de diferenciació cel·lular i normalment està ubiquament expressada [32,33]. Els prostanoides formats a través de l'acció de la COX-1 anomenats *housekeeping* estan relacionats en processos homeostàtics com control de mucosa estomacal, hemostàsia o funcions renals [31].

El centre peroxidasa de la COX-1 té menys afinitat amb els hidroperòxids que la COX-2 i per tant necessita concentracions més elevades per desencadenar la catàlisi [34].

Els NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) són principalment inhibidors de la COX com per exemple l'aspirina, l'ibuprofè, el flurbiprofè i el naproxè. Aquests inhibidors no són selectius i inhibeixen tots els isoenzims de la COX. Disminueixen la síntesi de PGs i TXs i per tant redueixen la inflamació local del

teixit. També tenen acció antipirètica, antitrombòtica i analgèsica. L'efecte advers més generalitzat que tenen els NSAIDs és que causen toxicitat gàstrica i renal i hemorràgies.

La COX-2 (72 KDa) és indetectable en la majoria de teixits normals. Es tracta d'un enzim induïble per hormones, factors de creixement, citoquines pro-inflamatòries, endotoxines bacterianes, hipòxia i promotors tumorals [30,32]. Esdevé molt abundant en macròfags activats i altres cèl·lules de regions inflamades on l'activitat COX deixa de ser el factor limitant. S'ha demostrat que l'activitat total de la COX, en situacions no inflamatòries de diferents tipus cel·lulars, és el pas limitant en la biosíntesi de prostanoides [35-39]. Tot i així, aquesta situació pot canviar quan la COX-2 és sobreexpressada en situacions inflamatòries fent augmentar l'activitat COX total.

Una sobreproducció de PGH<sub>2</sub> de les cèl·lules endotelials pot ser transferida a altres tipus cel·lulars com les plaquetes (mecanisme transcel·lular) sempre i quan la Prostaglandina I<sub>2</sub> sintasa (PGIS) estigui inactivada i la PGH<sub>2</sub> pugui ser alliberada fora de la cèl·lula i captada per les plaquetes o altres tipus cel·lulars [40].

El descobriment de la COX-2 inicialment va donar peu a formular la hipòtesi que la COX-1 només està implicada en l'hemostàsia fisiològica i que la COX-2 està únicament implicada en la inflamació i el dolor inflamatori. Es pensava que els fàrmacs dissenyats per inhibir la COX-2, però no la COX-1, tindrien propietats antiinflamatòries i evitarien els efectes secundaris com el dany gastrointestinal, la toxicitat renal o l'hemorràgia. Ara sabem que el paradigma que assumia que la COX-2 (induíble) estava exclusivament vinculada a la



resposta inflamatòria mentre que la COX-1 (constitutiva) ho estava amb la hemostàsia és excessivament simplista. Un descobriment que contradiu aquest paradigma és que la COX-2 s'expressa en condicions basals o en resposta a una varietat d'estímuls fisiològics i que aparentment també juga un paper rellevant en l'hemostàsia [41-45]. A més, algunes proves, que inclouen l'expressió de la COX-2 en els teixits gàstrics normals, recolzen el concepte que la gastroprotecció és més complexa del previst inicialment, i que tant la COX-1 com la COX-2 poden contribuir a la síntesi de PGs gastroprotectores [46,47]. A més, Celecoxib i Rofecoxib són inhibidors específics de la COX-2 dels quals s'ha demostrat que augmenten el risc d'accident vascular [48].

## 2.4 BIOSÍNTESI I ACTIVITAT BIOLÒGICA DELS PROSTANOIDES PRINCIPALS

### TROMBOXÀ A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>):

Identificat el 1975 [49], fa funcions biològiques oposades a la PGI<sub>2</sub>. La seva biosíntesi és catalitzada per la TXA<sub>2</sub>Sintasa (TXAS), que és un enzim de la superfamília del Cytocrom P450 [50,51].

Aquest enzim permet una nova disposició del pont endoperòxid de la PGH<sub>2</sub> per un mecanisme complementari al de la PGIS que consisteix en l'escissió de l'O<sub>2</sub> del C-9 que construeix el pont endoperòxid. L'O<sub>2</sub> del C-11 inicia una reordenació intramolecular que es dona tant per formar TXA<sub>2</sub> com per la síntesi de l'Àcid 12-hydroxiheptadecatrienoic (12-HHT). El TXA<sub>2</sub> té una estructura força inestable que en condicions aquoses (biològiques) és ràpidament hidrolitzat a TXB<sub>2</sub> que no té cap activitat biològica.

La funció del TXA<sub>2</sub> ve caracteritzada pel seu receptor TP. El TP és un receptor de la família dels GPCR (*G protein-coupled receptor*), receptors units a una proteïna G que en unir-se a una molècula de TXA<sub>2</sub> produeix un augment de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular i dóna lloc a l'activació plaquetària i a la coagulació de la sang (hemostàsia), a més de ser broncoconstrictor [51]. Les plaquetes tenen molt TXAS i produeixen una quantitat elevada de TXA<sub>2</sub>. Com podem veure existeix una elevada similitud molecular amb la mateixa PGH<sub>2</sub>, de manera que ens trobarem que la PGH<sub>2</sub> és reconeguda pels receptors del TXA<sub>2</sub> exercint la mateixa funció.

Hi ha dos tipus de receptors. El TP $\alpha$  que està unit a una proteïna G<sub>s</sub> que activa l'adenilat ciclasa (AC) i per tant fa augmentar els nivells d'adenosina monofosfat cíclic (AMP<sub>c</sub>), i el TP $\beta$  que està unit a una proteïna G<sub>i</sub> que inhibeix l'AC i disminueix els nivells d'AMP<sub>c</sub>. Ambdós receptors difereixen entre ells només per una mutació en l'Arg-60.

PROSTAGLANDINA I<sub>2</sub> (Prostaciclina, PGI<sub>2</sub>):

Va ser identificada el 1976 [52] i és sintetitzada per la PGIS. Aquest enzim també forma part de la superfamília d'enzims pertanyents al Cytocrom P450 monooxidasa [53]. L'estructura de la PGIS no es va determinar fins el 2006 [54].

Això no obstant, el 1989 Hecker i Ullrich ja havien determinat el mecanisme catalític de la PGIS [50]. El centre actiu ferro-heme interacciona amb l'O<sub>2</sub> del C-11 de la PGH<sub>2</sub> produint l'escissió hemolítica de l'anell endoperòxid per formar una nova unió entre el C-9 i el C-5. L'anell resultant de la PGI<sub>2</sub> és molt inestable

i és ràpidament hidrolitzat a una estructura més estable i biològicament inactiva, la 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>.

La PGI<sub>2</sub> s'uneix al seu receptor l'IP [55,56] que és un tipus de receptor unit a una proteïna G i exerceix la funció de prevenció de la formació i agregació plaquetària (inhibeix l'activació plaquetària). És també un vasodilatador eficaç. Com podem veure té una acció biològica contrària al TXA<sub>2</sub>, la qual cosa suggereix que l'acció de la PGI<sub>2</sub> i el TXA<sub>2</sub> determina l'hemostàsia cardiovascular. La PGI<sub>2</sub> també es pot unir a receptors PPAR<sub>αγδ</sub> (*Peroxisomeproliferator-actived receptor*) [57,58]. Els PPAR<sub>αγδ</sub> són receptors nuclears que actuen com a factors de transcripció regulant l'expressió de gens.

La PGIS s'inactiva catalíticament més de pressa que la COX en situacions inflamatòries [40,59]. Un altre mecanisme d'inactivació de la PGIS són els derivats de l'òxid nítric [36,60], de manera que en aquestes situacions es converteix en factor limitant en la biosíntesi de la PGI<sub>2</sub> [36,40].

#### PROSTAGLANDINA D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>):

La PGD<sub>2</sub> és un isòmer estructural de la PGE<sub>2</sub> [61] en què els substituents 9-oxo i 11-hidroxi es troben en aquest cas al costat contrari. Estan formats per simples reordenaments no oxidants (isomeritzacions) de la PGH<sub>2</sub>. Aquestes reaccions es poden donar *in vitro* de forma espontània o enzimàticament catalitzades per sintases específiques. Trobem la PGD<sub>2</sub> en quantitats importants en homogenats de cervell de rata [62] i la seva funció principal és la d'activar els mastòcits [63].

La seva síntesi està liderada per dos enzims, la lipocalin-PGD<sub>2</sub>sintasa (l-PGDS) i l'hematopoiètic-PGD<sub>2</sub>sintasa (h-PGDS). L'l-PGDS no requereix el cofactor *glutathione* mentre que la h-PGDS sí que l'utilitza per a la seva catàlisi.

La catàlisi de l'l-PGDS consisteix en la formació d'un enllaç transitori entre el grup tiol de la Cys-65 i l'O del C-11 de la PGH<sub>2</sub> degut a la seva proximitat (5Å). D'aquesta manera s'obre l'anell endoperòxid de la PGH<sub>2</sub>. Un grup sulfidril exogen allibera l'H del C-11 per donar PGD<sub>2</sub> [64-66].

La PGD<sub>2</sub> té dos receptors identificats: el DP<sub>1</sub> i el seu homòleg, el receptor quimiotàctic, que s'expressa en els limfòcits Th<sub>2</sub> (CRTH2) [67].

El receptor DP<sub>1</sub> pertany a la família de receptors GPCRs i produeix un augment d'AMPc intracel·lular.

El receptor CRTH2 comparteix homologia amb el receptor DP<sub>1</sub> i sembla més estretament relacionat amb els receptors del Leucotriè B<sub>4</sub> (BLT1 i BLT2). El receptor CRTH2 augmenta els nivells de Ca<sup>2+</sup> i disminueix els nivells d'AMPc intracel·lulars [68].

#### PROSTAGLANDINA F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>):

Aïllada i caracteritzada per Samuelsson *et al.* a partir de fluid seminal humà l'any 1963 [69]. Es va veure que estimulava la musculatura llisa del duodè de conill. Involucrada en moltes malalties diferents i processos biològics, entre d'altres, vasoconstricció, inflamació aguda i aterosclerosi [70].

Només s'ha pogut clonar un receptor específic per la PGF<sub>2α</sub> anomenat FP [71]. Pertany a la família de receptors units a una proteïna G i augmenta els nivells de Ca<sup>2+</sup> intracel·lulars.

S'han clonat i caracteritzat 3 enzims biosintètics de la PGF<sub>2α</sub>: la PGFsintasa (PGFS) [72], la prostamida/PGFS [73] i la 9-ceto prostaglandina reductasa (9K-PGR) [74]. La PGFS humana va ser clonada el 1999 [73] i es va veure que era molt similar a l'aldo-ceto reductasa 1C3, a la vegada molt similar a l'mPGES-2 i a l'h-PGDS. La PGFS evoluciona de la família de les tioredoxines i conté motius C-x-x-C. La catàlisi consisteix en la reducció de l'O del C-9 de la PGH<sub>2</sub> a través de la transferència d'H<sup>+</sup> provinent del NADPH. Es produeix una escissió de l'endoperòxid de la PGH<sub>2</sub>. Posteriorment, l'O del C-11 es pot protonar gràcies a la presència d'H<sub>2</sub>O i així completar la reacció de formació de PGF<sub>2α</sub> [75]. S'ha vist que la PGFS pot utilitzar PGD<sub>2</sub> com a substrat.

#### PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>):

El 1963 es va identificar i aïllar la PGE<sub>2</sub> del plasma seminal [69]. Els efectes de la PGE<sub>2</sub> estan implicats en diferents patologies i en nombrosos processos biològics com la broncodilatació, la senyalització del dolor, la resposta immunològica innata i adaptativa, el càncer, l'artritis i l'aterosclerosi [76]. A grans trets la PGE<sub>2</sub> ha estat reconeguda com el prostanoide més rellevant en la resposta inflamatòria i també en el càncer. La PGE<sub>2</sub> també s'ha associat, com veurem més endavant, amb la fisiopatologia de l'AAA.

L'ampli ventall d'activitats, a vegades oposades, de la PGE<sub>2</sub> és degut a les diferències d'expressió dels seus 4 receptors EP<sub>1-4</sub> que tenen senyalitzacions diferents. Aquests receptors són proteïnes transmembrana unides a una proteïna G. EP<sub>1</sub> i EP<sub>3</sub> modulen la seva resposta a través de senyals de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, mentre que l'EP<sub>2</sub> i l'EP<sub>4</sub> produeixen un augment dels nivells d'AMPc intracel·lulars [77].

La síntesi de PGE<sub>2</sub> està catalitzada per l'enzim PGE-sintasa (PGES) de la qual se n'han identificat tres isoenzims: citosòlica (cPGES), microsomal-1 (mPGES-1) i microsomal-2 (mPGES-2) [78].

La cPGES va ser identificada l'any 2000 [81] a partir de mostres de teixit de cervell de rata i es va veure que era homòloga a la proteïna p23 humana. La proteïna va ser prèviament identificada com a p23 i amb funció de xaperona. Es va veure que la p23 (cPGES) interaccionava amb una altra xaperona la Hsp90 (proteïna de xoc tèrmic de 90 KDa) que és especialment abundant en la resposta a l'estrès tèrmic o tòxic. La interacció entre la p23 i la Hsp90 es va veure que augmentava l'activitat cPGES *in vitro* [79].

L'activitat catalítica de la cPGES requereix glutatió (GSH) com a cofactor i un residu de Tyr-9 [76,80]. El GSH interacciona amb l'O<sub>2</sub> del C-9 de la PGH<sub>2</sub> facilitant l'escissió del pont endoperòxid per la formació de la PGE<sub>2</sub>. S'ha descrit un acoblament funcional amb la COX-1 tot i que no es pot generalitzar [81,82].

L'mPGES-1 va ser caracteritzada per Jakobsson *et al.* el 1999 [83] com a proteïna pertanyent a la superfamília de les MAPEG (*membrane-associated-proteins-eicosanoids-glutathione*).

Aquest enzim també requereix glutatió per tenir activitat. Com que l'mPGES-1 encara no ha estat del tot cristal·litzada, s'ha utilitzat una proteïna molt similar, l'mGST (*microsomalglutathioneS-transferase*) per caracteritzar el mecanisme d'acció. S'han pogut identificar interaccions de la Arg-110 i Tyr-114 amb el grup C-terminal de la PGH<sub>2</sub> que posicionava el grup tiol del glutatió per la catàlisi biosintètica de la PGE<sub>2</sub>. L'expressió de l'mPGES-1 està coregulada amb la

COX-2 i les dues proteïnes estan ubicades en el reticle endoplasmàtic (RE) [84]. Encara que trobem la COX-2 al lumen i l'activitat de l'mPGES-1 la trobem a la cara citosòlica del RE, podem parlar d'un acoblament funcional [80], tot i que tampoc ho podem generalitzar [38].

Aquest enzim és induïble per citoquines proinflamàtiques. S'expressa en VSMC i en cèl·lules endotelials de microvasculatura (MVEC) però no es troba expressat en cèl·lules endotelials de la macrovasculatura [36,85,86].

L'activitat mPGES-2 no requereix el cofactor glutatió i es veu augmentada per la presència de grups tiols lliures. La isoforma humana es va clonar l'any 2002 [87] i es va veure que contenia seqüències C-x-x-C que la cPGES i l'mPGES-1 no tenien.

La unió d'un H amb Phe-112, Cys-110, Cys-113 i Tyr-107 disminueix el PKa de la Cys-110. Això permet que l'H del grup Tiol s'uneixi a l'O del C-11. D'aquesta manera es produeix l'escissió del pont d'endoperòxid i la creació d'una cetona a causa de l'O del C-9 per formar la PGE<sub>2</sub> [78]. L'mPGES-2 utilitza la PGH<sub>2</sub> de la COX-1 i de la COX-2 [32,80].

La 9-ceto-PGR i la Carbonil reductasa-1 (CBR-1) poden reduir la PGE<sub>2</sub> per formar PGF<sub>2α</sub> alterant els nivells de PGE<sub>2</sub> i la relació PGE<sub>2</sub>/PGF<sub>2α</sub> i per tant el metabolisme dels icosanoides [88].

## 2.5 INACTIVACIÓ DE LA PGE<sub>2</sub>

La *15-Prostaglandin dehydrogenase* (15-PGDH) inicia i lidera el catabolisme de les prostaglandines, lipoxines i HETEs, catalitzant una oxidació. Està formada

per dos isoenzims, la 15-PGDH-I i la 15-PGDH-II, tot i que els valors de la K<sub>m</sub> ens indiquen que, *in vivo*, la catàlisi es dona majoritàriament per la 15-PGDH-I [89]. Aquest enzim metabolitza les PGs de la sèrie 2, lipoxines, 15-HETEs, 5,15-diHETE i el 8,15-diHETE [90].

La 15-PGDH-I, després d'unir-se a una molècula NAD<sup>+</sup> i a la PGE<sub>2</sub>, coordina un radical 15-hidroxil entre els a/a Tyr-152, Ser-138 i Gln-148. La Tyr-151 desprotona la 15-hidroxil transferint el grup hídril del C-15 a la PGE<sub>2</sub>. D'aquesta manera es forma la 15-ceto-PGE<sub>2</sub> amb una activitat biològica baixa [90,91], tot i que s'ha demostrat que pot unir-se a receptors PPAR $\gamma$  i al 3T3-L1, un component actiu en la transformació dels fibroblasts en adipòcits [92].

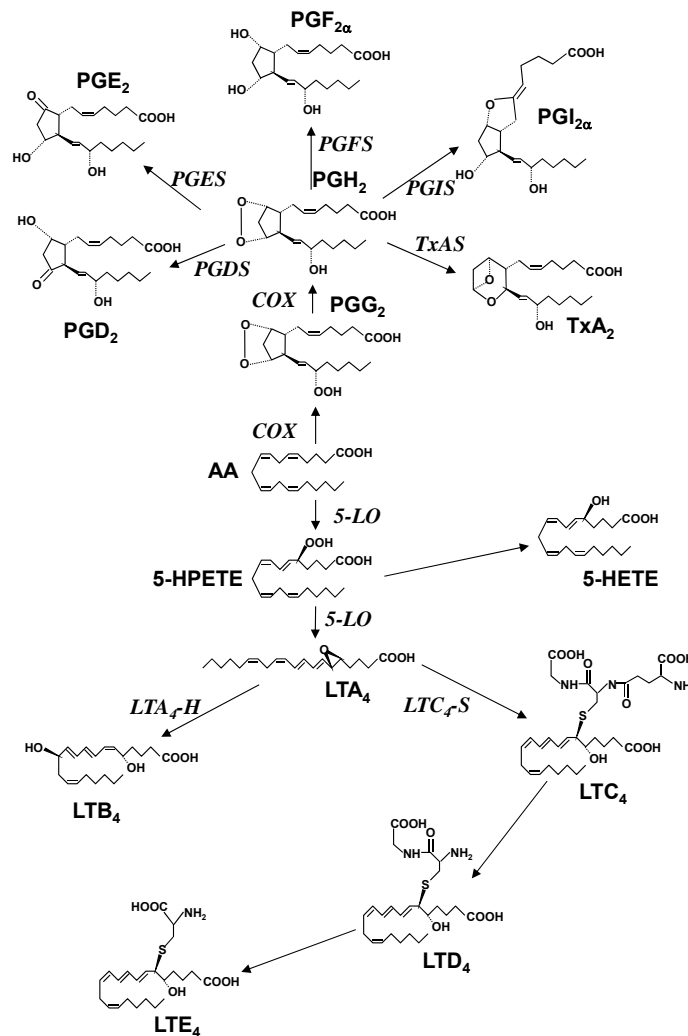
## 2.6 ELS LEUCOTRIENS

L'AA també pot ser substrat de les lipoxigenases (LOXs). Les LOXs són metal·looxigenases sense grup hemo-ferro que catalitzen la introducció d'una molècula d'O<sub>2</sub> dins de l'AA [93]. Concretament, la 5-LOX, com la COX, utilitza l'AA com a substrat per donar el primer leucotriè precursor de tota la resta, el Leucotriè A<sub>4</sub> que és substrat de diferents enzims. El Leucotriè B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) és sintetitzat a través de la catàlisi de la Leucotriè A<sub>4</sub> Hidrolasa (LTAH), i la síntesi del Cysteinil Leucotriè C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) està catalitzada per la Leucotriè C<sub>4</sub> Sintasa (LTCS) a partir del qual es sintetitzen el LTD<sub>4</sub> i el LTE<sub>4</sub> (Figura 5).

A diferència de la resta de les LOXs, la 5-Lipoxigenasa requereix la presència d'una proteïna d'activació, la proteïna FLAP (*Five-lipoxygenase-activating protein*) per la síntesi de leucotriens *in vivo*.



La ruta biosintètica dels Àcids Hidroxieicosatetraenoics (HETEs), de les Lipoxines i de les Hepoxilines, i de les Eoxines ve determinada per l'acció de la 12-LOX i de la 15-LOX.



**Figura 5.** Via de la síntesi de prostanoides i leucotriens. COX, ciclooxigenasa; PGFS, PGF-sintasa; PGDS, PGD-sintasa; PGIS, PGI-sintasa; TxAS, TxA-sintasa; mPGES, PGE-sintasa micrososomal; cPGES PGE-sintasa citosòlica; 5-LO, 5-Lipoxigenasa; LTA<sub>4</sub>H, Leucotriè A<sub>4</sub> Hidrolasa; LTC<sub>4</sub>S, Cysteinil Leucotriè C<sub>4</sub>.

## 2.7 RELLEVÀNCIA DE LA VIA DE LA PGE<sub>2</sub> EN LA PATOGÈNESI DE L'AAA

En termes generals podem assumir que la PGI<sub>2</sub>, la PGE<sub>2</sub>, la PGH<sub>2</sub> i el TxA<sub>2</sub> són els prostanoides de major rellevància en el context de la patologia

cardiovascular. Les plaquetes i els monòcits/macròfags produeixen TxA<sub>2</sub> abundantment. Les activitats "clàssiques" del TxA<sub>2</sub> són la vasoconstricció i l'agregació plaquetària, és a dir la trombosi. Com he mencionat anteriorment, la PGH<sub>2</sub> exhibeix la mateixa activitat biològica que el TxA<sub>2</sub> ja que s'uneix als mateixos receptors [94-96]. El TxA<sub>2</sub> i la PGH<sub>2</sub> també tenen activitats pro-inflamatòries i proaterogèniques degut que l'estimulació dels seus receptors indueix mitogènesi en les VSMC [94,96] i l'expressió de molècules d'adhesió en les EC [97]. El bloqueig dels receptors TxA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> suprimeix l'alliberació de MCP-1 per les EC estimulades [98] i la seva activació està també implicada en la migració i l'angiogènesi [99]. S'ha descrit que el TxA<sub>2</sub> podria estar implicat en la ruptura de l'AAA [100]. El nostre grup creu que això podria fer-se extensiu a la PGH<sub>2</sub> perquè les cèl·lules vasculars produeixen poc TxA<sub>2</sub> però en condicions inflammatòries poden alliberar gran quantitat de PGH<sub>2</sub> sense transformar quan la COX-2 es troba sobreexpressada [36,38,40].

La PGI<sub>2</sub> es produeix fonamentalment en les cèl·lules vasculars i, en general, la seva activitat biològica és oposada a la del TxA<sub>2</sub> i la PGH<sub>2</sub> [32]. S'ha observat que la pressió sanguínia basal i la freqüència cardíaca en ratolins deficients en l'IP no difereixen de la dels del grup de control. Tot i així, l'absència d'IP es tradueix en una major sensibilitat als estímuls protrombòtics [101]. Això suggereix que el paper de la PGI<sub>2</sub> no és la regular de la pressió sistèmica, sinó que més aviat actua sota demanda en la resposta a estímuls locals. Col·lectivament les accions biològiques de la PGI<sub>2</sub> poden considerar-se com antiaterogèniques. No existeix, però, informació sobre el paper de la PGI<sub>2</sub> en l'AAA.

En el cas de la PGE<sub>2</sub> la situació és diferent. La PGE<sub>2</sub> és un prostanoides

majoritari produït per molts teixits i tipus cel·lulars incloent-hi els leucòcits i totes les cèl·lules presents en el teixit vascular. Com ja s'ha mencionat, és en general el prostanoide més rellevant en la resposta inflamatòria. Els nivells elevats de PGE<sub>2</sub> regulen els diferents signes de la inflamació com el dolor, l'edema i la febre [102]. Les dades de la literatura suggereixen que la PGE<sub>2</sub> és també el prostanoide més rellevant en el desenvolupament i evolució de l'AAA. Entre altres activitats la PGE<sub>2</sub> indueix l'expressió de MMPs [103] i també inhibeix la producció de proteïnes de la matriu extracel·lular com poden ser la fibronectina i el col·lagen tipus I i III [104]. Tot i així, un aspecte que pot contrarestar l'efecte de la PGE<sub>2</sub> com a promotor de l'anoïkis en promoure la destrucció de la matriu extracel·lular és la seva activitat prosupervivència estudiada àmpliament en el context del càncer [105]. S'accepta avui en dia que la producció augmentada de la PGE<sub>2</sub> que es detecta en les situacions d'inflamació es deu fonamentalment al tàndem COX-2/mPGES-1. La COX-2 s'indueix després del dany vascular i està altament expressada en les lesions ateroscleròtiques i en l'AAA [33]. S'ha vist que la PGE<sub>2</sub> derivada de la COX-2 està implicada en la patogènesi de l'AAA en humans i en models animals [106-109]. També s'ha descrit que l'expressió de la COX-2 en les VSMC contribueix al desenvolupament de l'AAA en ratolins [110].

Com hem mencionat, la PGES catalitza la conversió de la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>. Els tres isoenzims de la PGES s'expressen en les VSMC però només l'mPGES-2 i la cPGES s'expressen en les EC de la macrovasculatura [39,84,85], encara que hem observat que l'mPGES-1 s'expressa en les EC de la microvasculatura [111]. Tot i que les EC dels macrovasos no expressen l'mPGES-1 [85,86], la PGH<sub>2</sub> no transformada pot transferir-se, per exemple, a cèl·lules tumorals

[40,86,106], a VSMC o leucòcits, que sí que expressen mPGES-1, per produir PGE<sub>2</sub>. Nosaltres i altres grups hem observat que les HUVEC, tot i expressar mPGES-2 i cPGES, no produeixen PGE<sub>2</sub> enzimàticament en les nostres condicions experimentals [36,86]. També hem observat que en les VSMC i en les cèl·lules mesangials glomerulars que expressen totes les PGESs només l'mPGES-1 sembla produir PGE<sub>2</sub> eficientment a partir de la PGH<sub>2</sub> [37,39,85]. Això pot explicar-se per les diferències en les constants cinètiques dels tres isoenzims de la PGES { Vm (PGE<sub>2</sub>): 170, 3.3, 1.9 μmol·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup>; Km (PGH<sub>2</sub>): 160, 28, 14 nM per l'mPGES-1, l'mPGES-2 i la cPGES respectivament } [81,87,112]. En resum, sembla que en condicions d'inflamació l'mPGES-1 és el principal isoenzim involucrat en la biosíntesi de la PGE<sub>2</sub>. Presumiblement, això també sigui cert en el context de l'AAA.

Per una altra banda, en cèl·lules, com les VSMC, que expressen l'mPGES-1 i la PGIS s'estableix una competició entre les dues pel substrat PGH<sub>2</sub>. Aquesta circumstància fa que la supressió de l'activitat d'una d'elles incrementa la producció del prostanoide produït per l'altre enzim. Això concorda amb la nostra observació que la supressió de l'mPGES-1 incrementa la producció de PGI<sub>2</sub> en les VSMC quan l'activitat COX no és el pas limitant [39]. Es podria esperar l'oposat quan l'activitat PGIS es suprimeix per la pèrdua de l'expressió de la PGIS o per l'acció de l'estrès oxidant; el peroxinitrit inactiva la PGIS [60]. Es pot extrapolar que aquesta última circumstància es pugui produir en el context de l'AAA.

El tàndem COX-2/mPGES-1 sembla el responsable de l'increment de PGE<sub>2</sub> observat en les reaccions inflamatòries. A més, els dos enzims s'indueixen per acció de citoquines proinflamatòries com la IL-1β. La regulació transcripcional

de l'mPGES-1 està encara sota investigació. Forsberg *et al.* [113] van determinar l'estructura del gen de l'mPGES-1 humana localitzat en el cromosoma 9q34.3. S'han detectat elements transcripcionals presents en altres membres de la família de les MAPEG com la caixa "barbie" i "aryl hydrocarbon regulatory element" (ARE). La regió promotora del gen s'ha estudiat en un intent de trobar semblances amb la COX-2. Però no s'ha pogut trobar cap dels elements transcripcionals, com les caixes "TATA", presents en el gen de la COX-2 o altres gens estimulats per citoquines [114]. Tot plegat suggereix que existeix una divergència entre la regulació de la COX-2 i l'mPGES-1. Estudis posteriors han ressaltat el paper de dos caixes "GC" en la inducció del gen per la IL-1 $\beta$  i el TNF $\alpha$  [115], així com l'expressió basal de l'mPGES-1 [116] pel qual s'ha proposat el paper del "early growth response gene-1" (Erg-1) [117]. S'ha descrit que el NF- $\kappa$ B pot promoure l'expressió de la COX-2 i l'mPGES-1 per una via dependent de l'EGR-1 [118,119]. Kojima *et al.* [120] han descrit que inhibidors selectius de la COX-2 poden disminuir els nivells de l'mPGES-1 en fibroblasts sinovials i condriòcits de pacients amb artritis reumatoide estimulats amb IL-1 $\beta$ , la qual cosa suggereix l'existència d'un *loop* negatiu entre COX-2 i mPGES-1. També s'ha descrit que la PGE<sub>2</sub> actuant a través dels receptors EP2 i EP4 regula a l'alça l'expressió de l'mPGES-1 el que va ser inhibit per inhibidors de la COX-2 selectius. S'ha postulat, doncs, que aquesta autoregulació de l'expressió de l'mPGES-1 pel seu propi producte PGE<sub>2</sub> pot ser en gran part responsable del cercle amplificador que es produeix en la inflamació [121].

El nostre grup ha reportat la importància de factors genètics en la determinació de la variació de fenotips que són components de les vies de síntesi de

prostanoides, particularment en l'expressió basal dels isoenzims de la COX, de la TxAS i l'mPGES-1 [122]. El seguit de factors genètics que influeixen fortament en la variació quantitativa d'aquests fenotips suggereix que serà possible identificar els gens que la regulen. Alguns d'aquests gens presumiblement afectaran múltiples aspectes de la biologia cel·lular amb una implicació clínica en l'AAA.

## 2.8 L'mPGES-1 COM A DIANA ALTERNATIVA ALS INHIBIDORS SELECTIUS DE LA COX-2

Tot i que la inhibició de la COX-2 redueix l'AAA experimental [109], s'ha observat en més de sis assajos clínics que la inhibició farmacològica de la COX-2 comporta cert risc cardiovascular [48]. Encara que la causa per la qual la inhibició de la COX-2 incrementa els esdeveniments cardiovasculars, aquest comportament no està definitivament esclarit. El grup de Garret FitzGerald ha descrit que els inhibidors selectius de la COX-2 redueixen els nivells de PGI<sub>2</sub> circulant sense modificar els nivells de TxA<sub>2</sub>, indicant que la COX-2 està implicada en la producció sistèmica de la PGI<sub>2</sub> [123]. La inhibició específica de l'mPGES-1 podria suposar una bona alternativa. El nostre grup ha aportat dades que sustenten el paper de l'mPGES-1 com una diana terapèutica d'interès cardiovascular [39,85,124]. En aquest sentit el laboratori de FitzGerald ha descrit que la supressió de l'expressió de l'mPGES-1 atenua el desenvolupament de l'AAA en un model experimental de ratolí [125]. Aquest grup ha estudiat el desenvolupament de l'AAA després de l'administració d'angiotensina II en ratolins deficients del receptor de l'LDL sotmesos a dieta hiperlipèmica. Malgrat que aquest estudi és estimulants, és necessari investigar

més en humans sobre el paper de l'mPGES-1 en l'AAA perquè el model utilitzat difereix notablement en molts aspectes del model humà d'AAA.

Assumint que les activitats biològiques de la PGE<sub>2</sub> recolzen el seu paper perjudicial en l'AAA, aquesta tesi està enfocada a proporcionar evidències sobre el paper de l'mPGES-1 i la resta de la via de la PGE<sub>2</sub> en l'AAA.

### 3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

El nostre interès principal és definir i caracteritzar els processos bioquímics de l'AAA. Fins ara, l'AAA i l'arteriosclerosi estan descrites com a malalties inflamatòries vasculares. Així com en l'arteriosclerosi es descriu com una infiltració de cèl·lules del sistema immunitari del lumen de les artèries cap a la capa íntima, la nostra hipòtesi, en el cas de l'AAA, planteja una infiltració leucocitària en la capa adventícia cap a la capa mitjana. Nosaltres pensem que si el lumen de l'artèria aorta està en bona part obstruït pel coàgul que s'hi genera, és difícil aquesta infiltració dels leucòcits des del lumen. Per aquest motiu pensem en una infiltració leucocitària en la capa adventícia a partir del *vasa vasorum* que irriga l'artèria aorta. Per altra banda en tractar-se d'un procés inflamatori vàrem pensar que la PGE<sub>2</sub>, principal prostaglandina inflamatòria, podria tenir un paper rellevant en l'activació del procés d'angiogènesi microcapil·lar que es genera en el transcurs de l'aneurisma.

Ens hem centrat a estudiar la via de la PGE<sub>2</sub> en relació a la hipervascularització associada a l'AAA. Per fer-ho hem definit els diferents objectius:

**Primer:** Estudiar la biosíntesi i degradació de la PGE<sub>2</sub> en mostres d'AAA i d'aorta normals humanes. Determinar l'expressió i localització de la COX-1, la COX-2, l'mPGES-1 i la 15-PGDH i determinar els nivells de metabòlits de la PGE<sub>2</sub> en sang.

**Segon:** Estudiar l'expressió i localització dels receptors de la PGE<sub>2</sub> en mostres d'AAA i d'aorta normal humanes. Caracteritzar quins tipus cel·lulars els expressen. Avaluar la contribució de l'endoteli vascular en la síntesi de PGE<sub>2</sub> en mostres d'AAA.



**Tercer:** Relacionar la biosíntesi de la PGE<sub>2</sub> i els seus receptors amb la hipervascularització associada a l'AAA. Estudiar la vascularització en mostres d'AAA i d'aorta normals. Proposar una via d'acció de la PGE<sub>2</sub> en l'activació de l'angiogènesi.

## 4. MATERIAL I MÈTODES

### 4.1 OBTENCIÓ DE TEIXIT D'AORTA (AAA I NA)

L'estudi va ser aprovat pel Comitè d'Ètica de l'Hospital de la Sta. Creu i St. Pau, i les mostres es van obtenir amb el consentiment firmat dels pacients.

Les biòpsies usades en l'estudi es van obtenir de 86 pacients malalts d'AAA sotmesos a tractament quirúrgic. Es van extreure biòpsies d'aorta abdominal infrarenal de 65 pacients, d'aorta juxtarenal de 18 pacients i d'aorta suprarenal de 3 pacients. La mitjana del diàmetre de l'aorta dels pacients va ser de  $66.7 \pm 13.5$  mm (mitja $\pm$ SD). El trombe intraluminal present en les mostres d'AAA es va separar prèviament a l'extracció de la biòpsia la qual es va rentar dues vegades amb PBS (*phosphate-buffered saline*) fred. Les mostres d'aorta abdominal normal es van obtenir de 25 donants multiorgànics sans i es van agafar de la zona infrarenal. La Taula 1 mostra les característiques dels individus inclosos en l'estudi.

**Taula 1.** Característiques clíniques individuals dels pacients d'AAA i controls (NA) inclosos en l'estudi. Factors demogràfics i de risc.

Característiques de les mesures	Nivells d'mRNA		Nivells de PGE <sub>2</sub> M en plasma		Secretoma
	AAA	NA	AAA	Controls	AAA
<i>Number</i>	86	25	39	39	32
<i>Aortic diameter (mm)</i>	66.7±13.5	-	63.3±9.8	-	68.26±13.1
<i>LD (&lt;55 mm)</i>	49.7±6.4	-	52.8±1.2	-	-
<i>MD (55-69.9 mm)</i>	60.1±3.2	-	59.9±3.6	-	-
<i>HD (≥70 mm)</i>	80.8±7.5	-	76.5±6.7	-	-
<i>Age (years)</i>	70.9±6.6	56.3±16.0	71.2±6.7	62.9±3.0	71.2±8.1
<i>Male</i>	84 (97.7%)	16 (64%)	35 (89.7%)	34 (87.2%)	32 (100%)
<i>Diabetes mellitus</i>	19 (22.1%)	2 (8%) <sup>a</sup>	10 (25.6%)	1 (2.6%)	6 (18.8%)
<i>Hypertension</i>	55 (64%)	2 (8%) <sup>a</sup>	34 (87.2%)	14 (35.9%)	22 (68.8%)
<i>Hyperlipidemia</i>	55 (64%)	2 (8%) <sup>a</sup>	30 (76.9%)	1 (2.6%)	21 (65.6%)
<i>Smoking habit</i>					
<i>Non-smokers</i>	7 (8.1%)	21 (84%) <sup>a</sup>	3 (7.7%)	30 (76.9%)	2 (6.2%)
<i>Current smokers</i>	26 (30.2%)	3 (12%) <sup>a</sup>	9 (23.1%)	6 (15.4%)	10 (31.2%)
<i>Ex-smokers</i>	53 (61.6%)	1 (4%) <sup>a</sup>	27 (69.2%)	3 (7.7%)	20 (62.5%)
<i>Coronary artery disease</i>	22 (25.6%)	0 <sup>a</sup>	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)
<i>Angor pectoris</i>	3 (3.5%)	0 <sup>a</sup>	1 (2.6%)	0	3 (9.4%)
<i>Myocardial infarction</i>	6 (7%)	0 <sup>a</sup>	6 (15.4%)	0	1 (3.1%)
<i>Coronary intervention/CABG</i>	13 (15.1%)	0 <sup>a</sup>	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)
<i>Chronic renal insufficiency</i>	36 (41.9%)	0 <sup>a</sup>	13 (33.3%)	0	10 (31.2%)
<i>Dialysis</i>	0 (0%)	0 <sup>a</sup>	0 (0%)	0	0
<i>Peripheral vascular disease</i>	44 (51.1%)	0 <sup>a</sup>	21 (53.8%)	0	17 (53.2%)
<i>Absence pulses</i>	29 (33.7%)	0 <sup>a</sup>	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)
<i>Intermittent claudication</i>	15 (17.4%)	0 <sup>a</sup>	7 (17.9%)	0	6 (18.8%)
<i>Cerebrovascular disease</i>	7 (8.1%)	1 (4%) <sup>a</sup>	4 (10.3%)	0	2 (6.2%)
<i>Cerebral vascular attack</i>	5 (5.8%)	1 (4%) <sup>a</sup>	3 (7.7%)	0	2 (6.2%)
<i>Transient ischemic attack</i>	2 (2.3%)	0 <sup>a</sup>	1 (2.6%)	0	0
<i>COPD</i>	27 (31.4%)	0 <sup>a</sup>	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)
<i>Antiplatelet users</i>	39 (45.9%)	1 (4%) <sup>a</sup>	19 (50%)	0	15 (48.4%)
<i>Statins users</i>	53 (61.6%)	0 <sup>a</sup>	30 (76.9%)	7 (17.9%)	19 (59.4%)
<i>IECAs users</i>	20 (24.1%)	0 <sup>a</sup>	13 (33.3%)	6 (15.4%)	8 (25.8%)
<i>NSAD users</i>	6 (7%)	0 <sup>a</sup>	3 (7.7%)	0	3 (9.4%)
<i>Corticoid users</i>	6 (7%)	0 <sup>a</sup>	1 (2.6%)	0	2 (6.2%)
<i>Immuno-suppressors users</i>	4 (4.7%)	0 <sup>a</sup>	0 (0%)	0	1 (3.1%)

En alguns casos degut a la naturalesa de les mostres control algunes de les característiques clíniques no han estat incloses i n'és probable una infraavaluació. Les variables són presentades en nombre i percentatges (%) i les variables contínues, com a mitjana±SD. Abreviacions: Aortic diameter: diàmetre transversal màxim de l'aneurisma en mm. Chronic renal insufficiency: velocitat de filtració glomerular (eGFR) <60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Ex-smokers: deixar de fumar <1 any. COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

## 4.2 ANÀLISI DEL NIVELL D'EXPRESSIONIÓ DE L'ARN MISSATGER EN TEIXIT D'AORTA

La quantificació relativa dels nivells d'RNAm dels gens d'interès es van analitzar per RT-PCR a temps real (*Real Time Polymerase Chain Reaction*).

Immediatament després de l'extracció de la biòpsia per tal d'estabilitzar l'RNA, el teixit d'aproximadament 3 x 3 mm es submergeix en 1 ml d'RNAlater (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) durant 24 h a 4 °C, transcorregudes les quals se n'extreu el líquid i el teixit s'emmagatzema a - 80 °C fins al seu processament.

### 4.2.1 EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL

L'RNA del teixit es va purificar amb el reactiu Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), basat en el mètode de Chomczynski i Sacchi. El teixit congelat es trosseja amb un bisturí i s'introdueix en un tub que conté la matriu *Lysing matrix D* (MP Biomedicals Germany GmbH, Alemanya) per homogenitzar-lo i s'afegeix 1 ml de Trizol.

El teixit s'homogenitza amb l'aparell FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH) sota les condicions 6 M/S, 60 segons.

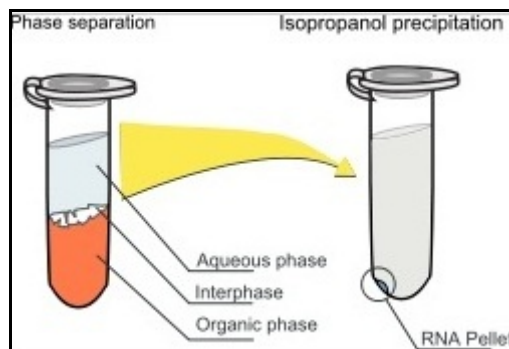
Els tubs es van incubar durant 30' en un bany d'aigua:gel agitant de tant en tant manualment.

Es centrifuga (13.000 r.p.m durant 5' a 4 °C) i s'extreu el sobrenedant en un nou tub.

S'afegeixen 200 µl de cloroform per cada ml de reactiu i s'agita amb el vòrtex.

Es deixa a temperatura ambient durant 10 minuts, agitant manualment.

Es centrifuga (13.000 r.p.m, 10 min a 4 °C), i s'extreu la fase aquosa superior. A la fase aquosa se li afegeixen 500 µl d'isopropanol, s'agita al vòrtex i es deixa una nit a - 20 °C perquè precipiti l'RNA. Els tubs es centrifuguen a 13.000 r.p.m. durant 10 minuts per obtenir l'RNA precipitat que es renta amb 1ml d'etanol al 75%. L'RNA precipitat es dissol en 50 µl d'H<sub>2</sub>O destil·lada lliure d'RNAsses. Les mostres s'emmagatzemen - 80 °C fins a la seva anàlisi.



**Figura 6.** En la fase de separació s'obté la fase orgànica (inferior), una interfase i la fase aquosa (superior) on hi ha l'RNA. Amb l'isopropanol, l'RNA precipita.

#### 4.2.2 DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I PURESA DE L'RNA

L'ARN es va quantificar segons l'absorbància a 260 nm (1 UA = 40 µg ARN), llegida en un espectrofotòmetre (*NanoDrop*, Thermo Scientific). La puresa de l'ARN ve determinada pel quocient 260/280, que per a ser òptim ha de tenir un valor d'entre 1,8 i 2.

#### 4.2.3 TRANSCRIPCIÓ REVERSA I PCR A TEMPS REAL (TagMan® Gene Expression Assay)

A partir d'1 µg d'RNA es sintetitza el DNA de cadena senzilla complementària (cDNA) per retrotranscripció (o transcripció reversa) utilitzant el *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode utilitza seqüències aleatòries com a oligonucleòtids encebadors (*random primers*) i la transcriptasa reversa *Multiscribe™*. Les condicions de la reacció són les següents:

REACCIÓ DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA	
Tampó 10X	2,0 µl
dNTP's	0,8 µl
Random Primers	2,0 µl
Trascriptasa Reversa (Multiscribe)	1,0 µl
H <sub>2</sub> O	4,2 µl
RNA	1 µg amb 10 µl d'H <sub>2</sub> O
<b>TOTAL</b>	<b>20 µl</b>

TEMPS I TEMPERATURES D'INCUBACIÓ DE LA RETROTRANSCRIPCIÓ	
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min

El cDNA es dilueix 1:10 amb H<sub>2</sub>O i s'emmagatzema a - 80 °C fins a l'amplificació per PCR a temps real, que es va realitzar mitjançant el sistema *TaqMan® Gene Expression Assay* i l'equip de detecció ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems). Aquest mètode permet mesurar a temps real l'amplificació de productes mitjançant un sistema de dos oligonucleòtids encebadors i una sonda específica per a la seqüència diana. La sonda té un fluorocrom en el seu extrem 3' i una molècula inhibidora o *quencher* en 5' que, per proximitat, bloqueja l'emissió de fluorescència de la primera. La sonda hibrida a la part central de l'amplicó, però no emet fluorescència fins que la

polimerasa topa amb ella i la hidrolitza. D'aquesta manera es detecta l'amplificació d'un determinat producte amb una elevada especificitat.

Per l'estudi, es van utilitzar les següents sondes TagMan:

<b>LLISTAT DE SONDES</b>			
	<b>SONDA</b>	<b>ESPÈCIE</b>	<b>REFERÈNCIA</b>
<b><u>CONTROLS ENDÒGENS</u></b>	β-ACTINA	HUMANA	Hs99999903_m1
<b><u>VIA CICLOOXIGENASA</u></b>	COX-1	HUMANA	Hs00377721_m1
	COX-2	HUMANA	Hs00153133_m1
	mPGES-1	HUMANA	Hs00610420_m1
	15-PGDH	HUMANA	Hs00960590_m1
	EP1	HUMANA	Hs00168752_m1
	EP2	HUMANA	Hs00168754_m1
	EP3	HUMANA	Hs00168755_m1
	EP4	HUMANA	Hs00168761_m1
<b><u>VIA 5-LIPOXIGENASA</u></b>	FLAP	HUMANA	Hs00233463_m1
	vWF	HUMANA	Hs00169795_m1
<b><u>NOS</u></b>	eNOS	HUMANA	Hs01574659_m1
<b><u>INTERLEUQUINES</u></b>	IL-8	HUMANA	Hs00174103_m1
<b><u>MARCADORS CEL·LULARS</u></b>	CD45	HUMANA	Hs00236304_m1
	CD68	HUMANA	Hs02836816_g1
<b><u>QUIMIOQUINES</u></b>	GROα	HUMANA	Hs00236937_m1
	MCP-1	HUMANA	Hs00234140_m1
	NAP-2	HUMANA	Hs00234077_m1
	RANTES	HUMANA	Hs00982282_m1
	TGFβ	HUMANA	Hs00998129_m1
<b><u>VEGF</u></b>	VEGFR2	HUMANA	Hs00173626_m1
<b><u>METALOPROTEÏNASES</u></b>	MMP-1	HUMANA	Hs00899658_m1
	MMP-2	HUMANA	Hs00234422_m1
	MMP-3	HUMANA	Hs00968308_m1
	MMP-9	HUMANA	Hs00224579_m1

Les condicions de la PCR van ser les següents:

REACTIU	VOLUM
MASTER MIX (2X)	5.0 µL
SONDA (25X)	0.5 µL
cDNA diluït	4.5 µL
<b>TOTAL</b>	<b>10 µL</b>
CICLE (T <sup>a</sup> )	TEMPS
50 °C	2 min
95 °C	10 min
95 °C	15 seg
60 °C	1 min

### 4.3 ANÀLISI DELS PROSTANOIDES PLASMÀTICS I ELS ALLIBERATS PEL TEIXIT AÒRTIC EN CULTIU

#### 4.3.1 OBTENCIÓ DE SECRETOMES

Les mostres d'AAA provinents del quiròfan i de NA de donants multiorgànics (100-200 mg) s'incuben durant 48 h a 37 °C amb 1 ml de medi DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) sense sèrum i amb penicil·lina (100 u/ml)-estreptomicina (10.000 u/10.000 µg), L-glutamina 200 mM i Piruvat Sòdic 100 mM.

Passades les 48 h el teixit es pesa. Es recupera el medi i s'emmagatzema al congelador a - 80 °C.

#### 4.3.2 OBTENCIÓ DE PLASMA

Es van extreure 10 ml de sang perifèrica de tots els pacients sotmesos al tractament quirúrgic abans de ser anestesiats i de donants en tubs amb



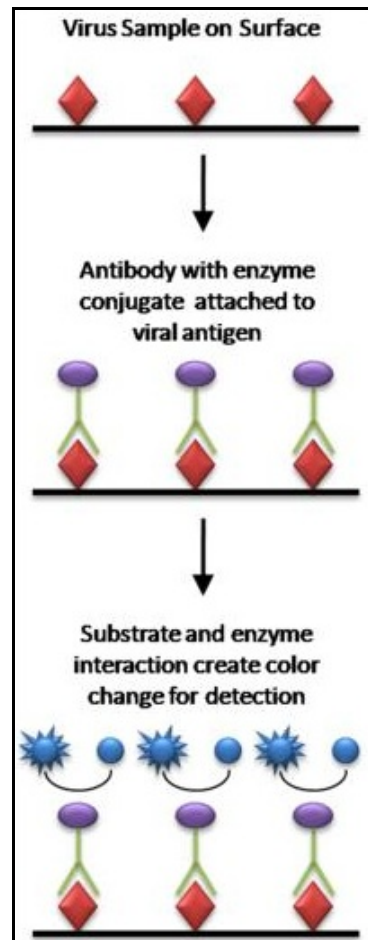
heparina. La sang es centrifuga immediatament i el plasma es congela aliquidat a - 80 °C fins a la realització de les anàlisis.

#### 4.3.3 ANÀLISI D'ICOSANOIDES

És conegut que la PGE<sub>2</sub> es transforma ràpidament *in vivo* en 13,14-dihidro-15-oxo-PGE<sub>2</sub> que és inestable i pateix una transformació més en 13,14-dihidro-15-oxo-PGA<sub>2</sub> [90,91]. Per avaluar els nivells de metabòlits de la PGE<sub>2</sub>, s'utilitza un *kit* d'immunoassaig enzimàtic (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) que converteix els metabòlits 13,14-dihidro-15-oxo de la PGE<sub>2</sub> en derivats més estables. Els nivells dels Met-PGE<sub>2</sub> són analitzats per EIA (*Enzyme Immuno Assay*) seguint les instruccions del fabricant.

Per quantificar la resta de prostanoides (PGE<sub>2</sub>, 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>) alliberats per secretomes en cultiu de teixit o plasma, s'ha utilitzat la tècnica d'EIA seguint les instruccions del fabricant (Cayman Chemical).

Tècnica d'EIA (Figura 8):



**Figura 8.** L'Ac primari reacciona amb els epitops de la mostra. Aquest Ac té acoblat un enzim que catalitza una reacció que emet llum de color. Posteriorment afegim el substrat perquè aquest enzim catalitzi la reacció i puguem mesurar l'absorbància de la llum emesa. Finalment relacionarem l'Abs amb una concentració (pg/ml) a través d'un estàndard.

#### 4.4 IMMUNOHISTOQUÍMICA

Després de la cirurgia, el teixit d'aorta es summergeix en una solució de formaldehid al 14% durant 24 hores. Seguidament s'inclou en parafina. Els estudis immunohistoquímics es realitzen en seccions de teixit de 3 micròmetres. Per la tinció específica dels elements de la via de la PGE<sub>2</sub>, el

factor von Willebrand (vWF, marcador de cèl.lules endotelials), el CD45 (marcador panleucocitari), el CD68 (marcador de macròfags), i la 15-PGDH s'han utilitzat els anticossos següents amb les diferents dilucions i referències:

ANTICÒS	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA	DILUCIÓ
<b>Anti-COX-2 de ratolí monoclonal</b>	Cayman Chemical	160112(Clone CX229)	1:50
<b>Anti-EP2 de conill policlonal</b>	Cayman Chemical	101750	1:1000
<b>Anti-EP3 de conill policlonal</b>	Cayman Chemical	101760	1:400
<b>Anti-EP4 de conill policlonal</b>	Cayman Chemical	101775	1:100
<b>Anti-mPGES-1 de conill policlonal</b>	Sigma-Aldrich	HPA045064	1:50
<b>Anti-vWF monoclonal</b>	Dako	M0616	1:35
<b>Anti-CD45 monoclonal</b>	Dako	IR751	1:1
<b>Anti-CD68 monoclonal</b>	Dako	IR7613	1:1
<b>Anti-15-PGDH de conill policlonal</b>	Cayman Chemical	160615	1:150

Els blancs es realitzen utilitzant els pèptids bloquejants corresponents de Cayman.

Per la microscòpia òptica, les seccions de teixit es processen en un equip Dako Autostainer Link 48, utilitzant el Dako Envision Flex Kit. S'utilitza diaminobenzidina com a cromogen.

#### 4.5 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Pels estudis de colocalització de la 15-PGDH i el CD45, es realitza immunodetecció doble fluorescent utilitzant el mètode seqüencial. Després de la desparafinació i desmascament dels antígens, es bloqueja la mostra a 4 °C durant tota la nit per evitar les unions inespecífiques dels anticossos. A continuació els anticossos s'apliquen seqüencialment incubant-se cada un d'ells durant 1 hora a temperatura ambient, realitzant rentats amb PBS després de cada incubació. Els teixits s'incuben primer amb els anticossos primaris

(apartat 4.4) i posteriorment s'incuben amb anticossos secundaris marcats fluorescentment.

Taula dels anticossos secundaris (IgG Alexa Fluor 594 i IgG Alexa Fluor 488 per les mostres amb anti-CD45 i anti-15PGDH respectivament) utilitzats i les seves dilucions:

ANTICÒS SECUNDARI	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA	DILUCIÓ
Anti IgG de ratolí (CD45)	Life Technologies	A-24923	1:200
Anti IgG de conill (15-PGDH)	Life Technologies	A-24922	1:200

Com a control negatiu, es realitzen portes en els quals s'ometen els anticossos primaris.

Pel muntatge dels cobreobjectes s'utilitza el reactiu *Prolong Gold antifade* amb DAPI (Molecular Probes, Life Technologies Co, Eugene, OR, USA). Per l'estudi de microscòpia làser confocal s'utilitza el microscopi confocal Leica SP5.

## 4.6 CULTIUS CEL·LULARS

### 4.6.1 CULTIU DE CÈL·LULES ENDOTELIALS DE VENA DE CORDÓ UMBILICAL HUMÀ (HUVEC)

Els cordons d'una longitud entre 15-20 cm es conserven a 4 °C fins al seu processament a la càmera de flux laminar. Es canula la vena del cordó per un extrem i es renta amb PBS pH 7.4. Seguidament es tracta amb una solució de col·lagenasa al 0.08% durant 10-15 minuts. Es recuperen les cèl·lules endotelials i es procedeix al cultiu primari.

La suspensió cel·lular es centrifuga a 250xg durant 10 minuts. Es suspèn el botó cel·lular en medi de creixement i es sembra en flascons de cultiu prèviament condicionats amb gelatina al 1%. Les cèl·lules es mantenen rutinàriament en medi base de creixement M-199 que conté L-glutamina 2 mM, piruvat sòdic 1 mM, penicil·lina/estreptomicina (100 U/100 µg)/ml, Hepes 20 mM, SBF 20%, heparina a 10 U/ml i ECGF 30 µg/mL, i es canvia cada 48 h.

Quan el cultiu arriba a la confluència es subcultiva i per fer-ho les cèl·lules es sotmeten a l'acció de la tripsina-EDTA (tripsina 0.25% i EDTA al 0.025%). Els experiments es realitzen amb cèl·lules en primer estadi.

Es mesuren els nivells d'mRNA dels diferents receptors de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>) seguint el protocol d'extracció d'mRNA de cultius cel·lulars (4.7.1).

#### 4.6.2 CULTIU DE FIBROBLASTS HUMANS

Els fibroblasts s'aïllen a partir de prepucis humans adults de pacients tributaris a postectomia. Els teixits es processen com s'ha descrit a l'apartat anterior fins al moment de la incubació amb tripsina. Després de la tripsina els fragments de teixit es posen en un flascó de cultiu amb 20 mL de col·lagenasa a la concentració de 0.5 mg/mL preparada amb medi DMEM que conté el 10% de SBF. La col·lagenasa digereix les dermis i s'obté una suspensió de fibroblasts. S'incuba durant 24 h a l'estufa de cultius (37 °C i 5% CO<sub>2</sub>). Finalitzada la incubació, el medi es filtra a través d'una gasa estèril i es centrifuga a 250xg durant 10 minuts per eliminar la col·lagenasa. El botó cel·lular es ressuspèn en medi DMEM que conté 10% SBF, L-glutamina 2 mmol/L, penicil·lina 200 U/mL, estreptomicina 200 µg/mL i es sembren en flascons de 75 cm<sup>2</sup>.

Es mesuren els nivells d'mRNA dels diferents receptors de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>) seguint el protocol d'extracció d'mRNA de cultius cel·lulars (4.7.1).

#### 4.6.3 CULTIU DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES VASCULARS HUMANES (VSMC)

Les VSMC aïllades són procedents d'artèries poplíteals d'aorta de donants multiorgànics. Un cop extreta l'artèria es trosseja longitudinalment i l'endoteli és eliminat suaument mitjançant un raspat. El teixit es submergeix en medi DMEM que conté el 10% d'SBF (sèrum boví). Quan les cèl·lules arriben als estadis entre 4 i 7 es mantenen en medi al 1% de SBF durant 48 h abans de qualsevol tractament.

Es mesuren els nivells d'mRNA dels diferents receptors de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>) seguint el protocol d'extracció d'mRNA de cultius cel·lulars (4.7.1).

#### 4.6.4 CULTIU DE CÈL·LULES ENDOTELIALS DE MICROVASCULATURA HUMANES (MVEC)

Cèl·lules aïllades de prepuci humà de pacients adults tributaris a postectomia. Els prepucis després de la cirurgia es recullen amb tampó fosfat (PBS) suplementat amb: penicil·lina 200 U/mL, estreptomina 200 µg/mL i amfotericina B 0.5 µg/mL (*biological industries*). Els prepucis es tallen a quadrats de 3 mm que s'incuben a 37 °C durant 30 minuts en una solució de tripsina al 0.3% i EDTA 1% amb PBS. Posteriorment els trossos es renten amb PBS i es dipositen en una placa de Petri en medi M199 que conté un 10%

d'SBF. Els fragments es comprimeixen individualment amb la part plana del bisturí per extreure'n els microvasos. El medi, que conté les cèl·lules, es filtra a través d'un filtre de 150 µm de porus a 300xg durant 15 minuts. Les MVEC es sembren en un flascó de cultiu recobert de gelatina i es cultiven en medi MCDB 131 amb un 20% d'SBF, L-glutamina 2 mmol/L, penicil·lina 200 U/mL, estreptomicina 200 µg/mL, EGF 20 ng/mL i bFGF 5 ng/mL (tot de *Biological Industries*). Quan les cèl·lules arriben a la confluència, es purifiquen amb Dynabeads CD31 (*Dynabeads, Invitrogen Dynak ASA, Oslo, Norway*), seguint les instruccions del fabricant. La puresa de la població cel·lular es determina per citometria de flux i tinció positiva de CD31, també denominat molècula d'adhesió de plaquetes a cèl·lules endotelials (*platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1*).

Els cultius cel·lulars en estadis de creixement de 3 inoculacions s'utilitzen per a les determinacions d'mRNA dels diferents receptors de la PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1-4</sub>), factors proangiogènics, i per a les determinacions de la proteïna IL-8 seguint el protocol d'extracció d'mRNA de cultius cel·lulars (4.7.1). I els cultius en estadis de 5 a 7 inoculacions s'utilitzen per a l'anàlisi de l'angiogènesi en resposta a la PGE<sub>2</sub> i per la immunofluorescència de l'EP4 i l'mPGES-1.

Els nivells de la proteïna IL-8 alliberada per cultius de MVEC s'analitzen per EIA seguint les instruccions del fabricant (Cayman Chemical). Dels cultius de MVEC incubats en 1 µmol/L de PGE<sub>2</sub> o bé en Cay10598 (agonista EP4) durant 24 h n'analitzem a diferents temps els nivells d'mRNA dels diferents factors de creixement (Gro<sub>α</sub>, IL-8, MCP-1, RANTES, TGF-β, VEGF-A, MMP-1 i MMP-2) seguint el protocol d'extracció d'mRNA de cultius cel·lulars (4.7.1).

## 4.7 ANÀLISI DEL NIVELL D'EXPRESSIONI DE L'RNA MISSATGER EN CÈL·LULES EN CULTIU

### 4.7.1 EXTRACCIÓ D'RNA TOTAL DE CÈL·LULES EN CULTIU

Extraiem el medi de cultiu i hi afegim 1 ml d'Ultraspect (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX). Amb una pipeta l'agitem varies vegades per trencar les cèl·lules.

L'Ultraspect (Sals de Guanidina i Urea) actua com un agent desnaturalitzant. És un reactiu molt efectiu per a l'extracció i purificació de l'RNA total de les cèl·lules.

La solució resultant passa pel mateix protocol de precipitació i càlcul de la concentració d'RNA descrit als apartats 4.2.1 i 4.2.2 respectivament.

Els protocols de Retrotranscripció i RT-PCR són iguals que els descrits en l'apartat 4.2.3.

## 4.8 IMMUNOCITOQUÍMICA

Per la tinció d'immunofluorescència de la mPGES-1 i l'EP-4 de cèl·lules d'endoteli microvasculars en cultiu, les cèl·lules es sembren en Millicell EZslide (Milipore Corporation, Billerica, MA) i quan s'arriba al 80% de confluència es fixa amb metanol:acetona 1:1 a - 20 °C durant 20 minuts. Les preparacions es renten amb PBS i es bloquegen amb albúmina al 1% durant 1 h. Les cèl·lules s'incuben amb anticossos primaris anti-mPGES-1 i anti-EP4 durant 60 minuts.



ANTICÒS PRIMARI	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA	DILUCIÓ
Anti-mPGES-1 monoclonal de ratolí	Cayman Chemical	10004350	1:100
Anti-EP4 policlonal de comill	Cayman Chemical	101775	1:100

Les preparacions es renten amb PBS dues vegades i s'incuben amb els anticossos secundaris marcats fluorescents: cabra anti-IgG de ratolí marcat amb Alexa Fluor 488, per les mostres incubades amb anti-mPGES-1, i ase anti-IgG de conill marcat amb Alexa Fluor 555, per les mostres incubades amb anti-EP4 durant 1 h.

ANTICÒS SECUNDARI	CASA COMERCIAL	REFERÈNCIA	DILUCIÓ
Anti-IgG de ratolí (mPGES-1)	Invitrogen	A-24920	1:200
Anti-IgG de conill (EP-4)	Invitrogen	A-27039	1:200

Els nuclis es tenyeixen amb Hoest 33342 (Sigma) 1 µg/mL amb PBS durant 10 minuts. Les preparacions es munten amb *Prolong Gold Antifade Reagent* (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR) i es fotografien amb un microscopi Olympus BX50.

#### 4.9 ANÀLISI *IN VITRO* DE L'ANGIOGÈNESI

El procés d'angiogènesi s'analitza a nivell *in vitro* amb cultius de cèl·lules endotelials de microvasculatura. Es sembren  $12.5 \times 10^3$  cèl·lules sobre el Matrigel (Becton Dickinson Matrigel Basement Membrane Matrix) en una placa de 96 pous i s'exposen als tractaments requerits.

Els cultius de MVEC s'incuben amb 10 nmols/L de PGE<sub>2</sub> exògena (*Cayman Chemical Item Number 14010*) o bé amb 10 nmols/L d'un agonista del receptor EP4, Cay10598 (*Cayman Chemical Item Number 13281*). Per tal de bloquejar

aquest efecte s'incubem 200 nmols/L de l'antagonista del receptor EP4 AH23848 (*Calcium salt, hydrate*).

Per als assajos amb IL-1 $\beta$  les cèl·lules són preincubades durant 1 h en dos medis diferents abans de ser sembrades al Matrigel: un amb 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  recombinant humana (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) i l'altre sense.

Després de 4 h de tractament s'han fotografiat els cultius amb una càmera Olympus IMT-2 muntada sobre un microscopi invertit utilitzant un objectiu 10X/0.40. Es realitza un comptatge de les estructures cel·lulars tancades en cercles.

#### 4.10 ANÀLISI ESTADÍSTICA

Per a l'anàlisi estadística s'utilitza el *software* Sigma-Stat. Quan en la significació estadística entre més de dos grups els resultats entren dins d'una distribució normal s'utilitza el test ANOVA i l'Student-Newman-Keuls. El test T-Student s'utilitza per comparar dos grups.

Quan falla la distribució normal s'utilitza el test Mann-Whitney Rank Sum per comparar dos grups i el mètode de Dunn per més de dos grups (Kruskal-Wallis one Way Analysis of Variance on Ranks for Multiple Comparisons).

Per realitzar les correlacions estadístiques entre diferents grups i variables s'utilitza la correlació de Pearson (Pearson Product Moment Correlation), on el valor de "p"  $\leq$  0,05 es considera significatiu.

#### 4.11 ESTRATIFICACIÓ DELS PACIENTS EN FUNCIÓ DEL DIÀMETRE DE L'AORTA

S'ha utilitzat el diàmetre transversal màxim de l'aneurisma mesurat en mil·límetres (mm). Per determinar el diàmetre trasnversal màxim s'ha utilitzat en tots els casos angio-TC mil·limetrat amb contrast endovenós. Es va utilitzar el diàmetre transversal màxim a la llum del vas, realitzant un *center line* a nivell infrarenal. Per fer-ho s'han utilitzat les estacions de treball AGFA IMPAX, versió 6.4.4.4010 i la Osirix MD, versió FDA cleared/CE IIa per al diagnòstic primari.

Els pacients es van estratificar segons la mida de l'AAA, es van distribuir en tres grups de la manera següent:

- *Low Diameter* (LD), AAA<55mm: 14 pacients.
- *Moderate Diameter* (MD), AAA entre 55.1-69.9mm: 37 pacients.
- *High Diameter* (HD), AAA≥70mm: 35 pacients.

Per aquesta classificació es van tenir en compte referències prèvies amb estratificacions similars i d'aquesta manera es van poder comparar els nostres resultats amb els d'altres grups [133-135].

A l'estudi, existeixen pacients amb aortes per sota del rang quirúrgic (<55mm). Això és degut que tot i que no se sol iniciar una reparació quirúrgica de l'AAA a no ser que el diàmetre hagi superat els 55 mm de diàmetre transversal màxim, hi ha pacients intervinguts per creixement aòrtic ràpid (>0.5 cm/6 mesos o >1 cm/12 mesos) o aortes <55 mm reparades per coexistència de patologia aneurismàtica ilíaca en rang quirúrgic. Les mostres arterials obtingudes en cas d'afectació ilíaca concomitant van ser sempre aòrtiques i la biòpsia va ser de la

mateixa porció arterial que en el cas d'aneurismes aòrtics purs per tal d'homogeneïtzar al màxim les mostres d'AAA.

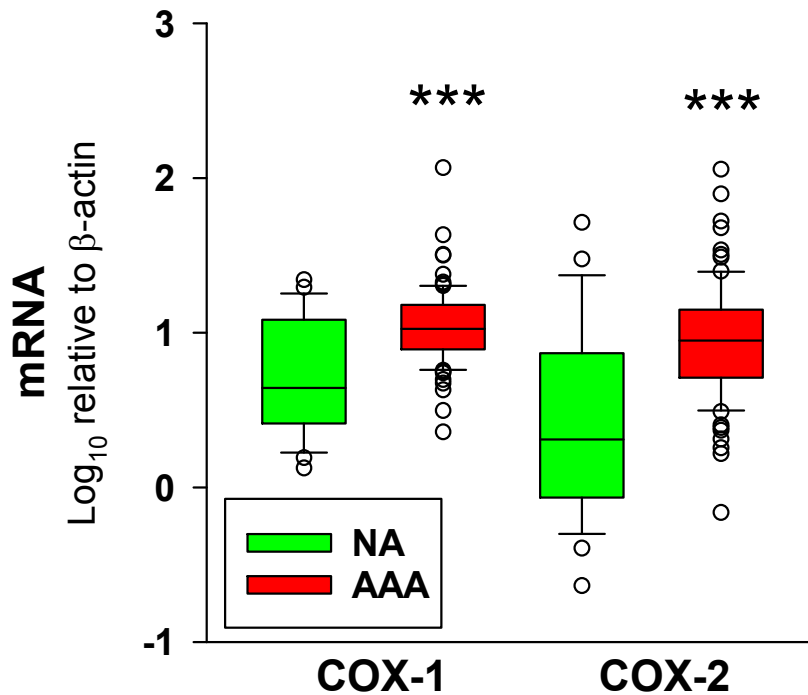


## **5. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

### **5.1 ANÀLISI DEL METABOLISME DE LA PGE<sub>2</sub> EN TEIXIT AÒRTIC**

#### **5.1.1 NIVELLS D'mRNA DE LA COX-1 I DE LA COX-2 EN MOSTRES DE NA I D'AAA. EXPRESSIÓ DELS ISOENZIMS DE LA COX**

Per tal de caracteritzar la via de la PGE<sub>2</sub> en l'AAA hem analitzat en primer lloc la ruta de biosíntesi de la PGE<sub>2</sub> en mostres de teixit de pacients i de donants. Els nivells d'mRNA dels isoenzims de la COX de les mostres dels pacients d'AAA han estat comparats amb els nivells de les mostres dels donants (Figura 11). Les característiques dels pacients i donants estan especificades en la Taula 1. La distribució dels valors obtinguts no segueixen una distribució estadística normal. Tal i com mostra la Figura 11 els dos isoenzims de la COX estan més expressats en les mostres d'AAA.



**Figura 11.** Nivells d'mRNA dels isoenzims de la COX. S'han determinat els nivells d'mRNA de la COX-1 i de la COX-2 en mostres de NA (n=25) i mostres d'AAA (n=86). La caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%. \*\*\*p<0.001 quan es compara amb el grup de NA.

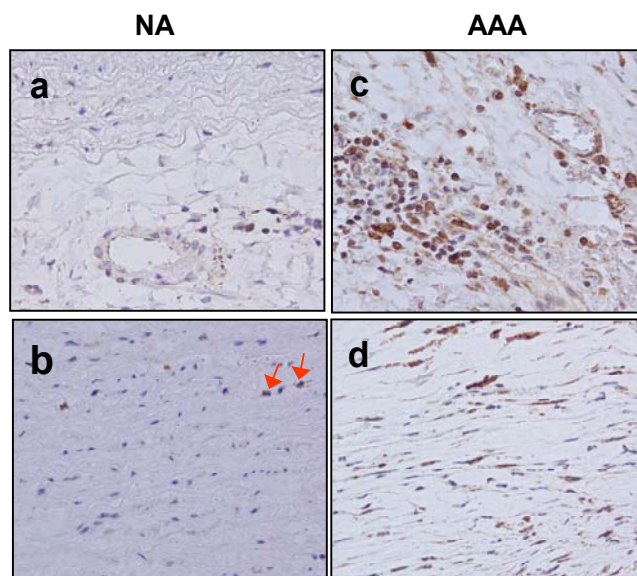
L'AAA és una patologia inflamatòria. Com a conseqüència d'aquesta inflamació seria lògic esperar un augment de l'isoenzim induïble de la COX, és a dir, de la COX-2 [30,32,33] en les mostres d'AAA. També seria lògic que els nivells d'expressió de l'isoenzim constitutiu de la COX (COX-1) no estiguessin augmentats en les mostres d'AAA respecte de les de NA [30,32,33]. No obstant, els nostres resultats mostren que els nivells d'mRNA, tant de la COX-2 com de la COX-1, estan augmentats en les mostres d'AAA. Els dos principals factors que podrien afectar els nivells d'expressió d'aquests dos isoenzims poden ser la sobreexpressió real (up-regulation) i la diferent proporció cel·lular que existeix entre les mostres de NA i d'AAA. La COX-1 està ubiqüament

expressada [30,32,33]. Per aquest motiu l'augment de la COX-1 podria ser degut a un augment dels tipus cel·lulars rics en COX-1 com els macròfags i/o les cèl·lules endotelials de la microvasculatura. Per altra banda, la COX-2 en ser un enzim induïble, es manté en les mostres control en una expressió baixa per sota dels nivells de la COX-1 mentre que en les mostres d'AAA veiem com els nivells de COX-2 són significativament més alts molt probablement per una *up-regulation*. Així doncs, cal esperar que l'augment de l'expressió de la COX-1 en les mostres d'AAA sigui degut a un canvi del patró cel·lular del parènquima (veure els resultats de la secció 5.4.3, Figura 35), mentre que la COX-2, en ser un enzim induïble, s'ha induït la seva expressió.

#### 5.1.2 LOCALITZACIÓ DE LA COX-2. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE LA COX-2

Per observar la localització de la COX-2 hem recorregut a la immunohistoquímica. S'han estudiat cinc mostres de teixit de NA i cinc mostres de teixit d'AAA amb resultats similars. La COX-2 s'ha trobat molt poc expressada en les mostres de NA. En les mostres de NA s'ha trobat que la COX-2 està bàsicament localitzada en les cèl·lules endotelials dels microvasos (MVEC) de la capa adventícia (Figura 12a) i en algunes VSMC de la capa mitjana (Figura 12b). En les mostres d'AAA, el patró d'expressió de la COX-2 en les cèl·lules del parènquima és qualitativament similar al de les mostres de NA però amb extensió major (Figures 12c i 12d). A més, la COX-2 es troba també en àrees d'infiltració leucocitària (Figura 12c).



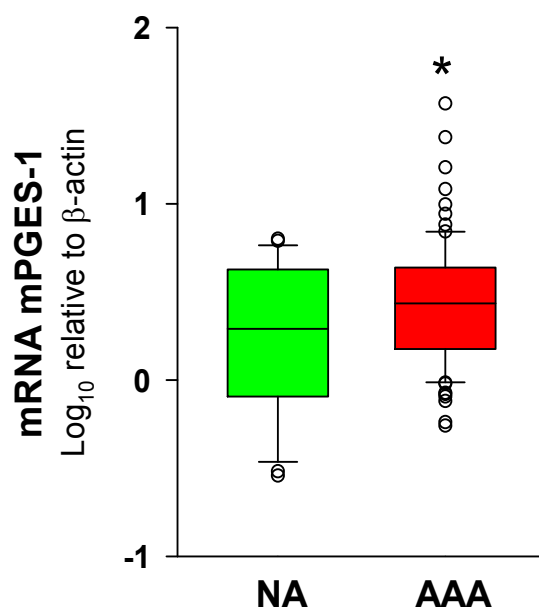


**Figura 12.** Exemples d'immunohistoquímica per la COX-2 en mostres de NA i AAA. En les mostres de NA veiem cèl·lules tenyides en els microvasos **(a)** i en la capa mitjana **(b)**. En mostres d'AAA veiem algunes cèl·lules tenyides en els microvasos de la capa adventícia i en leucòcits infiltrants **(c)** i algunes cèl·lules tenyides en la capa mitjana **(d)**.

Aquests resultats demostren que la COX-2 s'expressa en les MVEC i en les VSMC de la capa mitjana particularment en les mostres d'AAA. En el cas de les mostres d'AAA també veiem que la COX-2 s'expressa en els leucòcits infiltrants. Tots els nostres resultats que fan referència a la COX-2 mostren que aquesta està més expressada en les cèl·lules vasculars i en leucòcits infiltrants de les mostres d'AAA que no pas en les de les mostres de NA. Aquests resultats suggereixen que la COX-2 està efectivament sobreexpressada (up-regulated) en les MVEC de les mostres d'AAA. Els nostres resultats coincideixen amb els resultats d'altres autors que troben un augment de l'expressió de la COX-2 en l'AAA [23].

### 5.1.3 EXPRESSIÓ DE L'mPGES-1 EN MOSTRES DE NA I D'AAA

El pas específic en la síntesi de la PGE<sub>2</sub> està catalitzat per l'enzim PGES essent l'mPGES-1 l'isoenzim més rellevant en condicions d'inflamació [39,80,83,84]. Per aquest motiu hem analitzat els seus nivells d'mRNA en les mostres de NA i d'AAA. Els resultats de la Figura 13 mostren que l'expressió de l'mPGES-1 també està significativament més elevada en les mostres d'AAA respecte de les mostres de NA. Aquests resultats tampoc no segueixen una distribució estadística normal.



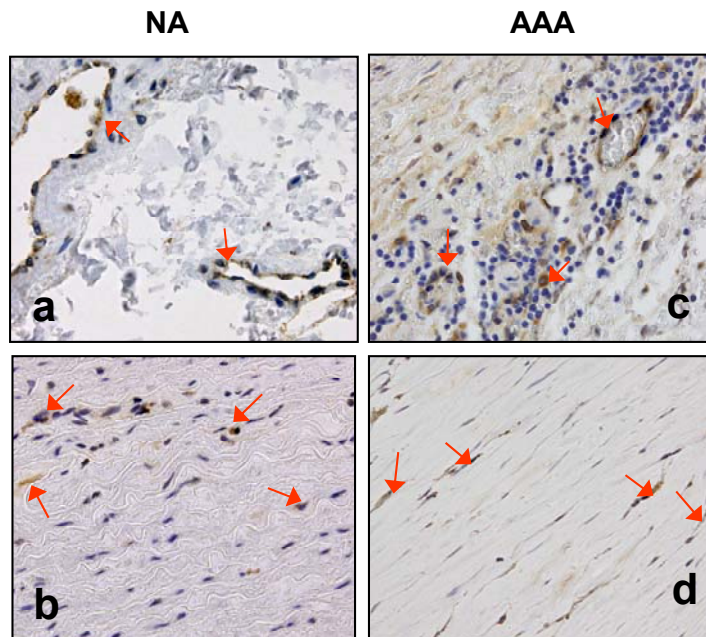
**Figura 13.** Nivells d'mRNA de l'mPGES-1 en les mostres de NA (n=25) i en les mostres d'AAA (n=86). La caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%. \*p<0.05 quan ho comparem amb el grup de NA.

Les mostres d'AAA, tot i experimentar un augment significatiu dels nivells d'mRNA de l'mPGES-1, no presenten diferències tan importants com en el cas

de la COX-2 en comparar-les amb els nivells de les mostres de NA. Això podria ser degut que l'mPGES-1 no està induïda en el mateix grau que la COX-2 degut que no estan regulades de la mateixa manera [37,39]. No tots els factors que indueixen la COX-2 indueixen l'mPGES-1. Per exemple, hem observat que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que també se sap que té un paper important en processos inflamatoris [126,127], estimula l'expressió de la COX-2 però no té cap efecte sobre els nivells d'mPGES-1 (resultats encara no publicats). Un altre factor que podria produir aquest modest increment de l'expressió de l'mPGES-1 pot ser la pèrdua de VSMC típica dels AAA degut que les VSMC en cultiu expressen en abundància l'mPGES-1 tal i com el nostre grup ha publicat prèviament [39,85]. Segurament, la contribució d'aquests dos factors fa que l'expressió total de l'mPGES-1 no sigui tan diferenciada entre les mostres d'AAA i de NA com en el cas de la COX-2.

#### 5.1.4 LOCALITZACIÓ DE L'mPGES-1. IMMUNOHISTOQUÍMICA DE L'mPGES-1

Utilitzant la immunohistoquímica identifiquem el patró d'expressió d'aquest enzim dins les mostres d'aorta de NA i d'AAA. En les cèl·lules vasculares, el patró de tinció de l'mPGES-1 és similar en les mostres de NA (Figura 14a i 14b) i d'AAA (Figura 14c i 14d). Detectem mPGES-1 en les MVEC (Figura 14a i 14c) i en cèl·lules de la capa mitjana (Figura 14b i 14d). Addicionalment, algunes cèl·lules tenyides per l'mPGES-1 es troben en zones d'infiltració leucocitària en les mostres d'AAA (Figura 14c).

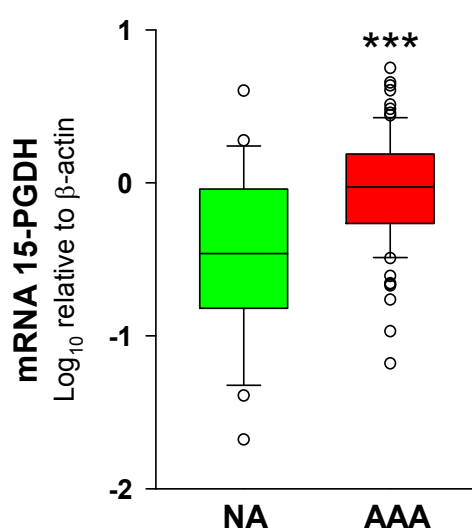


**Figura 14.** Immunohistoquímica de l'mPGES-1 en mostres d'aorta; les fletxes indiquen algunes cèl·lules tenyides, en microvasculatura de mostres de NA (a), en la capa mitjana de mostres de NA (b), en leucòcits infiltrants i microvasculatura de mostres d'AAA (c) i en la capa mitjana de mostres d'AAA (d).

Amb aquests resultats podem afirmar la presència de l'mPGES-1 en totes les cèl·lules vasculares dels teixits d'aorta incloent-hi les VSMC [39,76]. Els resultats actuals confirmen els nostres resultats previs on s'observa l'expressió de l'mPGES-1 en cèl·lules musculars en cultiu [39,84]. Això ens permet concloure que si hi ha menys augment en l'expressió de l'mPGES-1 que en la de la COX-2 en les mostres d'AAA respecte de les de NA és majoritàriament degut que hi ha menys VSMC, però en cap cas perquè aquestes no l'expressin i es pugui trobar efectivament sobreexpressada en les cèl·lules vasculares romanents. A més, ens evidencien una ruta biosintètica de la PGE<sub>2</sub> en les cèl·lules vasculares.

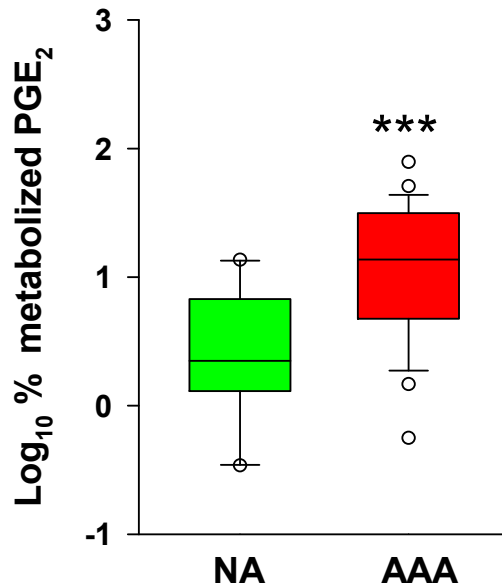
### 5.1.5 METABOLISME DE LA PGE<sub>2</sub>. EXPRESSIÓ DE LA 15-PGDH

Com que la viabilitat de la PGE<sub>2</sub> també depèn de la seva degradació que està regulada inicialment per la 15-PGDH [89], també determinem els nivells d'expressió d'aquest enzim. Els nivells d'expressió de la 15-PGDH són significativament més elevats en les mostres d'AAA que no pas en les mostres de NA (Figura 15).



**Figura 15.** Nivells d'mRNA de la 15-PGDH en mostres de NA (n=25) i d'AAA (n=86); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%; \*\*\*p<0.001 quan ho comparem amb el grup de NA.

A la Figura 16 es mostren els resultats del percentatge de metabòlits de la PGE<sub>2</sub> en teixit d'aorta de NA i d'AAA. Coherents amb la major expressió de la 15-PGDH en les mostres d'AAA (Figura 15), observem que efectivament el percentatge de la PGE<sub>2</sub> metabolitzada és també significativament major en les mostres d'AAA.



**Figura 16.** Percentatge de metabòlits de la  $PGE_2$  en mostres de teixit de NA ( $n=15$ ) i d'AAA ( $n=32$ ) incubades in vitro durant 48h; la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%. \*\*\* $p < 0.001$  quan es compara amb el grup de NA.

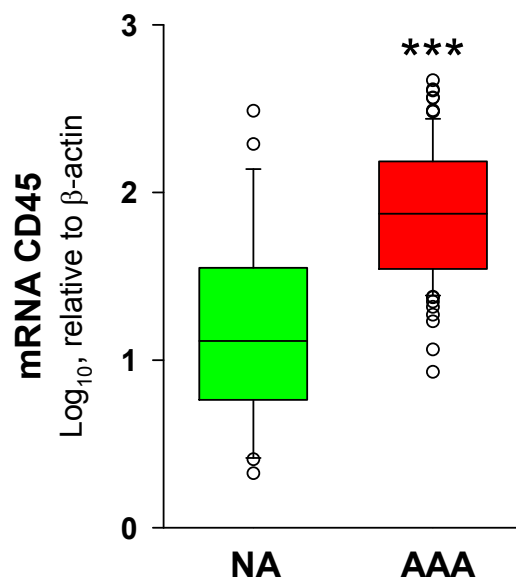
Tot el metabolisme de la  $PGE_2$  està estimulat en el cas de les mostres d'AAA. Els nivells tant dels enzims de síntesi de la  $PGE_2$ , la COX-2 i l'mPGES-1, així com de l'enzim que degrada i inactiva la  $PGE_2$ , la 15-PGDH, es troben augmentats en les mostres d'AAA. La 15-PGDH no s'expressa en les cèl·lules vasculares en cultiu (dades no mostrades) de manera que cal demostrar quines cèl·lules són les que aporten l'activitat 15-PGDH.

#### 5.1.6 EXPRESSIÓ DEL MARCADOR DE LEUCÒCITS CD45

Per tal de determinar quins tipus cel·lulars aporten l'activitat 15-PGDH hem analitzat els nivells d'mRNA d'un marcador de leucòcits.

Al llarg del procés inflamatori es produeix un reclutament al teixit vascular de cèl·lules del sistema immunitari [14]. Les cèl·lules del sistema immunitari infiltren en la capa adventícia i mitjana de la paret aòrtica contribuint al procés inflamatori amb l'alliberament de diferents molècules inflamatòries com les citoquines [24,25].

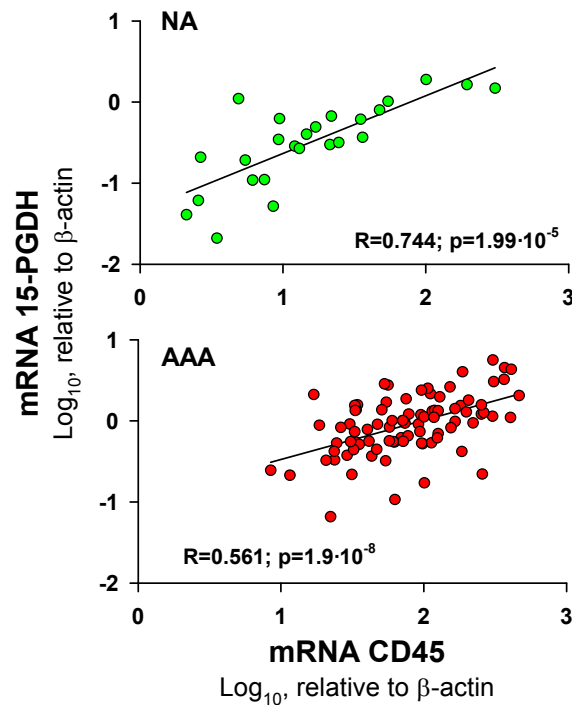
Una de les possibles explicacions podria ser que la infiltració dels leucòcits fos la responsable de l'increment de l'expressió de la 15-PGDH en les mostres d'AAA. Tal i com podem veure en la Figura 17, els nivells d'mRNA de CD45 augmenten significativament en les mostres d'AAA.



**Figura 17.** Nivells d'mRNA de CD45 en mostres de NA (n=25) i mostres d'AAA (n=86); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%. \*\*\*p<0.001 quan comparem amb el grup de NA.

Per poder observar si l'expressió de la 15-PGDH està associada als leucòcits infiltrants hem estudiat el grau d'associació dels nivells de la 15-PGDH i del

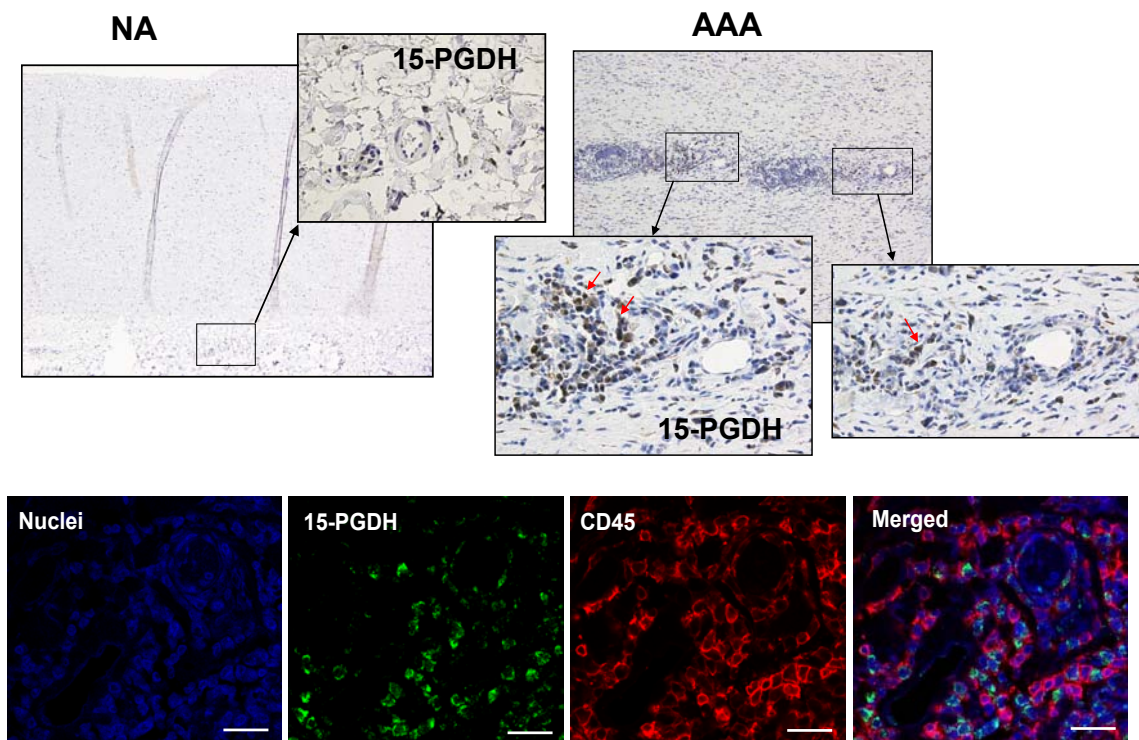
CD45, considerant-los variables independents. Trobem una elevada correlació entre els valors d'mRNA del marcador de leucòcits CD45 i de la 15-PGDH tan en les mostres de NA com en les d'AAA (Figura 18).



**Figura 18.** Correlació entre els nivells d'mRNA de la 15-PGDH i del marcador de leucòcits CD45 en les mostres de NA (n=25) i les mostres d'AAA (n=86).

Veiem que l'augment del nivell d'expressió de la 15-PGDH mostra una excel·lent correlació amb l'augment del nivell d'expressió del marcador CD45 tant en les mostres de NA com en les mostres d'AAA. Aquests resultats ens indiquen que la variació en els nivells de 15-PGDH està estadísticament associada a la variació en la presència de leucòcits. Per tal de corroborar els resultats anteriors hem analitzat la ubicació de la 15-PGDH en mostres de NA i d'AAA (Figura 19).





**Figura 19. A.** *Immunohistoquímica de la 15-PGDH en mostres de teixit de NA i d'AAA. Les fletxes ens indiquen algunes cèl·lules tenyides en la zona d'infiltració leucocitària de les mostres d'AAA. B.* *Resultats de la doble immunofluorescència de la 15-PGDH i el marcador de leucòcits CD45 en teixit aòrtic d'AAA.*

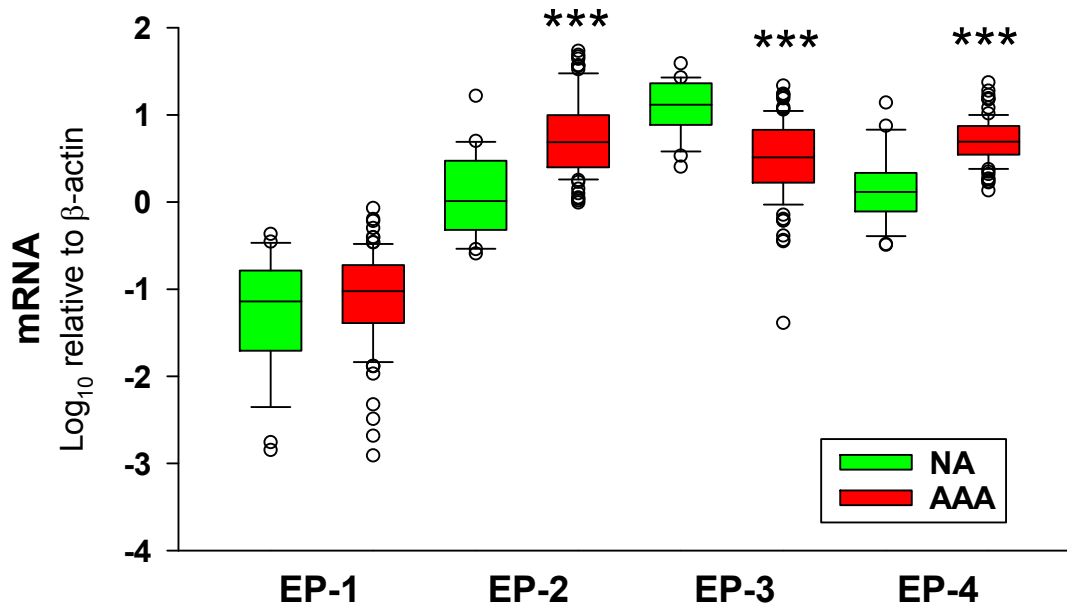
Com podem veure a la Figura 19, la 15-PGDH s'expressa en les mostres d'AAA al voltant dels microcapil·lars de les capes mitjana i adventícia, concretament en la zona d'infiltració leucocitària, mentre que en les mostres de NA no veiem una presència clara de la 15-PGDH en les cèl·lules de les capes mitjana i adventícia. Amb aquests resultats podem afirmar amb més força que la 15-PGDH s'expressa majoritàriament en els leucòcits i no pas en les cèl·lules del parènquima vascular, de manera que cal suposar que la PGE<sub>2</sub> es degrada més ràpidament en els leucòcits que en les cèl·lules del parènquima vascular.

## 5.2 ESTUDI DELS RECEPTORS DE LA PGE<sub>2</sub> EN EL TEIXIT AÒRTIC

### 5.2.1 EXPRESSIÓ DELS RECEPTORS DE LA PGE<sub>2</sub> EN MOSTRES DE NA I D'AAA

Els efectes de la PGE<sub>2</sub> estan regulats per la presència dels seus receptors de membrana. Depenent del tipus de receptors que s'expressin en la superfície de la membrana dels diferents tipus cel·lulars que trobem en el teixit aòrtic, la PGE<sub>2</sub> tindrà un efecte o un altre. Per completar la caracterització de la via de la PGE<sub>2</sub> en l'AAA hem determinat l'expressió dels diferents receptors EPs en mostres de NA i en mostres d'AAA.

Els resultats de l'expressió dels diferents EPs tampoc no segueixen una distribució estadística normal. Com es pot observar en la Figura 20, el receptor EP1 s'expressa poc en el teixit aòrtic i no hi ha diferències entre mostres de NA i d'AAA. Els receptors EP2 i EP4 estan significativament augmentats en les mostres d'AAA mentre que l'EP3 està substancialment disminuït (Figura 20).



**Figura 20.** Nivells d'mRNA dels receptors de la PGE<sub>2</sub> en mostres de NA (n=25) i d'AAA (n=86); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%; \*\*\*p<0.001 quan els comparem amb NA.

El paper de l'EP3 en l'angiogènesi no és del tot clar [128,129]. El fet que aquest receptor s'expressi en les VSMC, explicaria aquesta reducció com a conseqüència de la pèrdua VSMC en les mostres d'AAA. L'altra explicació possible seria una *down-regulation* de l'expressió del receptor EP3 en l'AAA.

Un dels factors que intentem caracteritzar en aquest estudi és el procés d'angiogènesi que es dona en circumstàncies d'inflamació cronicada en teixits aneurismàtics [11,12]. Tant els resultats en models experimentals com en patologies i tant els resultats d'experiments *in vivo* com *in vitro*, demostren que els receptors EP2 i EP4 estan relacionats amb l'alliberament de factors proangiogènics i/o amb l'angiogènesi directament [130-132]. Per tant, aquests

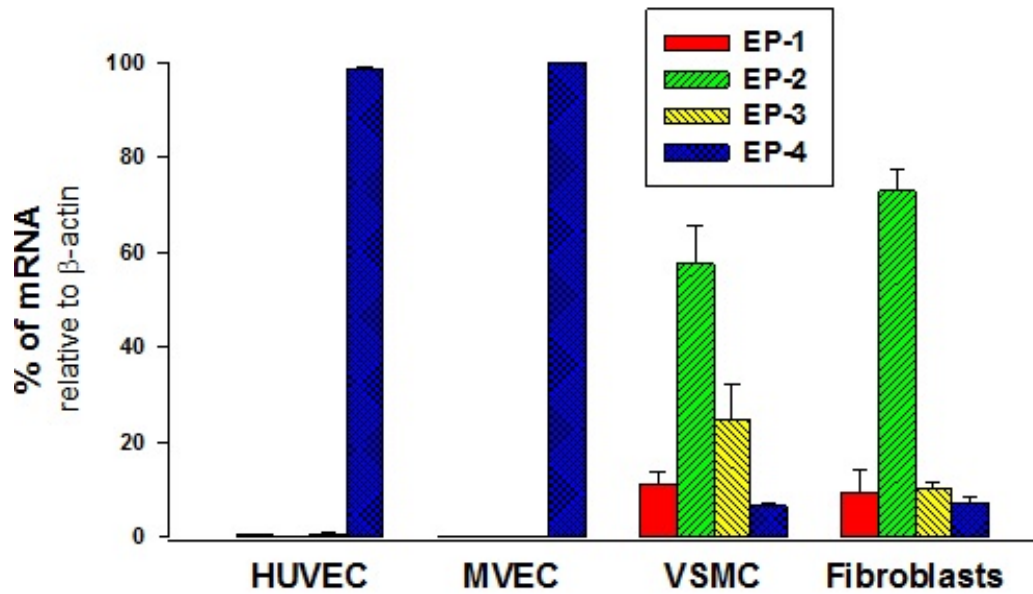
resultats donen suport a la idea que l'angiogènesi induïda en el procés aneurismàtic podria estar relacionada amb aquests dos receptors de la PGE<sub>2</sub>.

## 5.2.2 NIVELLS D'mRNA DELS DIFERENTS RECEPTORS EPs EN CÈL·LULES VASCULARS EN CULTIU

Un cop determinats els possibles receptors potencialment relacionats amb l'angiogènesi aneurismàtica que es produeix sobre les MVEC, ens interessa determinar en quin tipus cel·lular s'expressen per tal de poder fer un esquema del seu mecanisme d'acció.

A fi de determinar l'expressió dels diferents receptors en el teixit vascular n'hem determinat l'expressió en els diferents tipus cel·lulars del parènquima vascular en cultiu. Hem analitzat els nivells d'mRNA dels receptors de la PGE<sub>2</sub> en HUVEC, MVEC, VSMC i en fibroblasts en cultiu (Figura 21).

En cèl·lules endotelials, el receptor EP4 és pràcticament l'únic receptor que s'expressa. En VSMC, es detecten els 4 receptors de la PGE<sub>2</sub> essent l'EP2 el més abundant, seguit del receptor EP3. En fibroblasts, el receptor EP<sub>2</sub> és amb diferència el receptor més abundant. Resumint, l'EP4 s'expressa en les EC i MVEC, l'EP2 en les VSMC i fibroblasts i l'EP3 en les VSMC.



**Figura 21.** Percentatge dels nivells d'mRNA dels diferents receptors de la PGE<sub>2</sub> (EPs) en cultius d'HUVEC, MVEC, VSMC i fibroblasts (n=4).

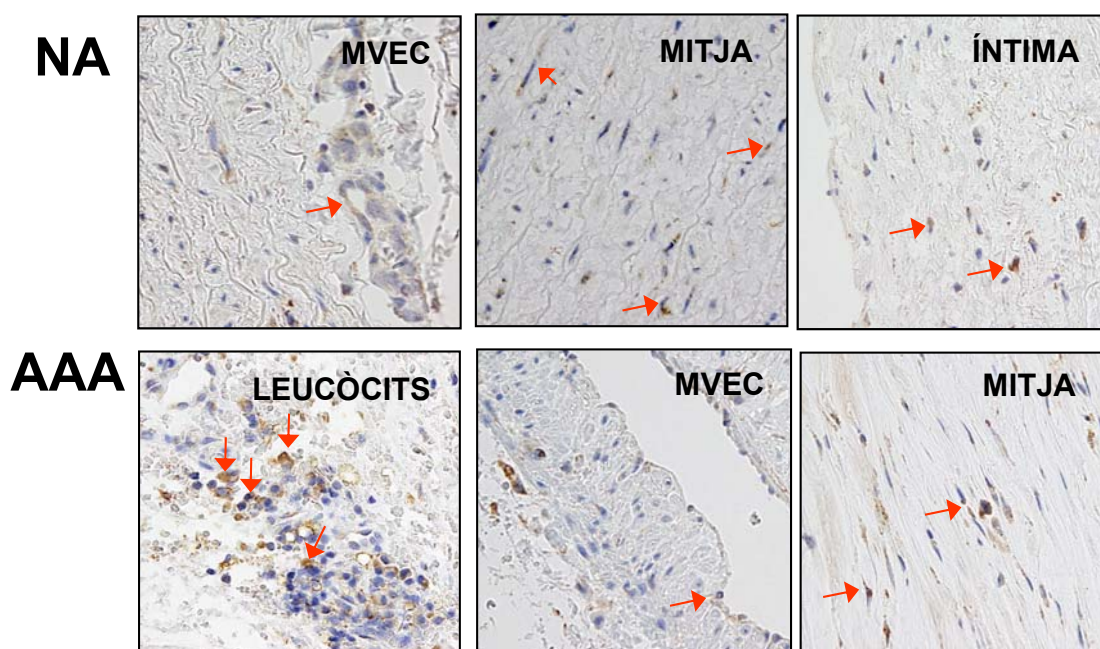
Aquests tipus cel·lulars s'expressen en diferents parts de la paret del vas aòrtic. Concretament, trobem les cèl·lules endotelials formant part de la capa íntima de l'aorta i en els *vasa vasorum*, les VSMC les trobem formant part de la capa mitjana i els fibroblasts, els trobem en la capa adventícia.

En el procés d'angiogènesi les cèl·lules endotelials, normalment quiescents, migren i es reproduïxen per formar nous brots vasculars que finalment es convertiran en nous vasos [12]. Per tant, seria en tot cas l'EP4, el receptor de la PGE<sub>2</sub>, el que podria estar directament relacionat amb l'angiogènesi induïda per la PGE<sub>2</sub>, degut que aquest receptor és el que s'expressa majoritàriament en aquest tipus cel·lular. Els altres receptors podrien tenir una acció indirecta si les cèl·lules que els expressen alliberessin factors proangiogènics en resposta a l'estimulació per la PGE<sub>2</sub>.

### 5.2.3 LOCALITZACIÓ DELS EPs EN LES MOSTRES D'AORTA

#### IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR EP2:

Hem fet tincions específiques pel receptor EP2 sobre mostres de teixit de NA i d'AAA amb l'objectiu de localitzar-ne l'expressió. En les mostres de NA el receptor EP2 s'expressa escassa i bàsicament en cèl·lules de la capa mitjana i en algun leucòcit infiltrant de l'íntima (Figura 22 NA). En les mostres d'AAA observem immunotinció fonamentalment en els leucòcits infiltrants de la capa adventícia i mitjana. Tant en mostres de NA com en mostres d'AAA la immunotinció de les MVEC és molt dèbil (Figura 22 AAA).



**Figura 22. NA.** Exemples de tincions amb anticòs específic pel receptor EP2 en mostres d'aorta normal; les fletxes indiquen algunes cèl·lules poc tenyides en microvasculatura (NA, MVEC) i algunes cèl·lules tenyides en la capa mitjana (NA, MITJA) i en la capa íntima (NA, ÍNTIMA). **AAA.** Exemple de tinció en mostres de teixit d'AAA; les fletxes indiquen alguns leucòcits infiltrants tenyits (AAA, LEUCÒCITS), cèl·lules poc tenyides en la microvasculatura (AAA, MVEC) i cèl·lules tenyides en la capa mitjana (AAA, MITJA).

Comparant els resultats anteriors dels nivells d'mRNA dels diferents receptors en els diferents cultius cel·lulars amb els resultats de la immunohistoquímica, podem afirmar que el receptor EP2 s'expressa en les cèl·lules de la capa mitjana (VSMC) i fonamentalment en els leucòcits que infiltren el teixit aneurismàtic. Aquests resultats són coherents amb l'observació que l'EP2 s'expressa escassament en les cèl·lules endotelials en cultiu mentre que s'expressa en major abundància en les VSMC (Figura 21). Al llarg del procés de l'AAA es produeix una pèrdua de les VSMC de la capa mitjana [18]. Aquesta conclusió tenint en compte el creixement observat de l'expressió de l'EP2 en les mostres d'AAA, suggereix que aquest augment és degut fonamentalment a la infiltració leucocitària.

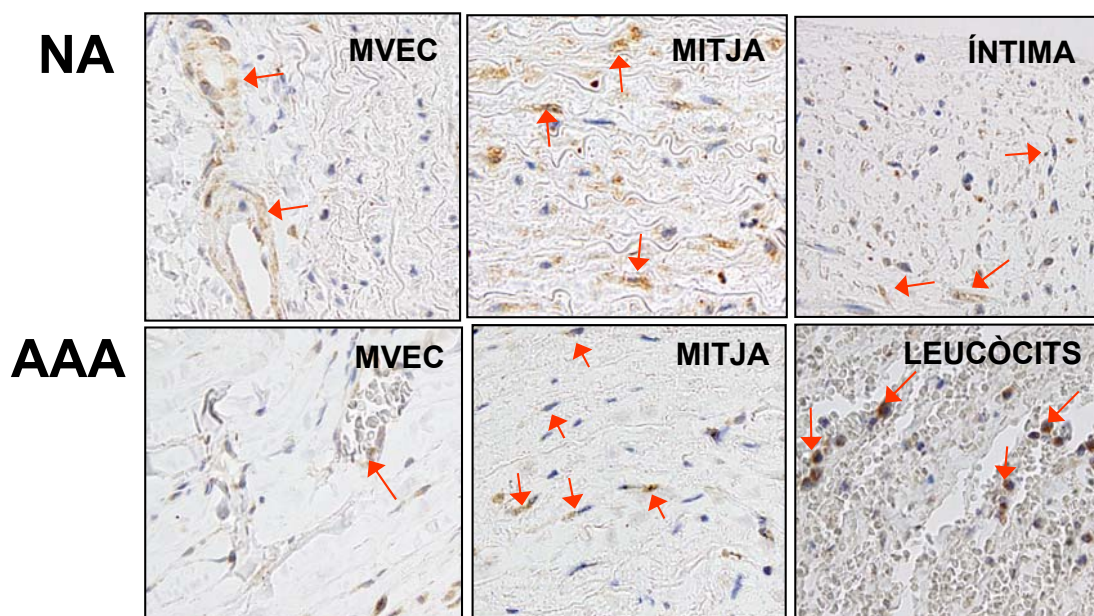
#### IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR EP3:

El receptor EP3 modula la seva resposta a través de senyals de  $Ca^{2+}$  intracel·lulars i sovint dona una resposta antagònica als receptors EP2 i EP4 [31]. Per determinar la localització del receptor EP3 hem fet tincions específiques per aquest receptor sobre mostres de NA i d'AAA (Figura 23).

Les tincions de les mostres de teixit de NA mostren que el receptor EP3 s'expressa abundantment en la capa mitjana (VSMC), mentre que la tinció dels microvasos és dèbil (Figura 23 NA). En les mostres de teixit d'AAA es reproduïx el mateix patró que en les mostres de NA amb la diferència que veiem que hi ha una expressió del receptor EP3 en els leucòcits infiltrants (Figura 23 AAA).

Trobem una dèbil expressió del receptor EP3 en els microvasos de les mostres de NA i d'AAA, la qual cosa és coherent amb el fet que les cèl·lules endotelials en cultiu mostren una escassa expressió d'EP3 (Figura 21).

Destaquem per tant una presència rellevant del receptor EP3 en les VSMC de la capa mitjana de la mostres de NA (Figura 23 NA MITJANA) i en les zones d'infiltració leucocitària de la capa adventícia (Figura 23 AAA LEUCÒCITS).



**Figura 23. NA.** Immunohistoquímica pel receptor EP3 en mostres control; les fletxes indiquen algunes cèl·lules tenyides en els microvasos (**NA MVEC**), en la capa mitjana (**NA MITJANA**), i en la capa íntima (**NA ÍNTIMA**). **AAA.** Immunohistoquímica pel receptor EP3 en mostres d'AAA; les fletxes indiquen algunes poques cèl·lules tenyides en la microvasculatura (**AAA MVEC**), en la capa mitjana (**AAA MITJANA**), i en els leucòcits infiltrants de la capa adventícia (**AAA LEUCÒCITS**).

Al llarg del procés aneurismàtic es produeix la degradació de la MEC [16] i com a conseqüència, la mort de les VSMC [18] que expressen en abundància l'EP3.

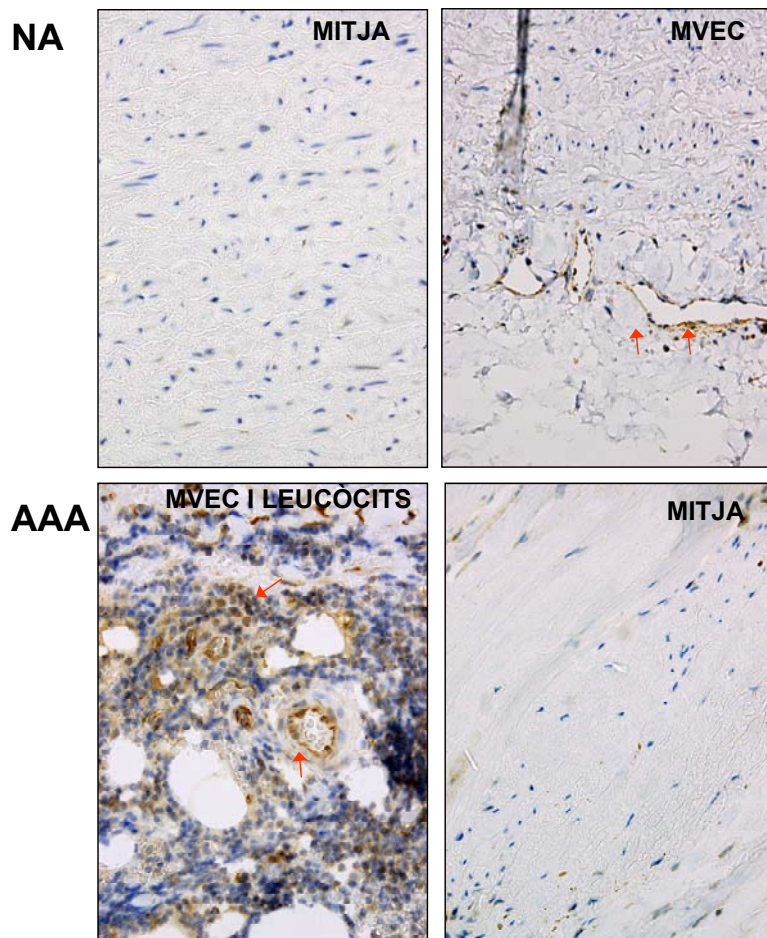


Aquest fet explicaria la disminució de l'expressió total de l'EP3 en les mostres d'AAA.

#### IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL RECEPTOR EP4:

Finalment hem estudiat l'expressió del receptor EP4 en mostres de teixit aòrtic de NA i d'AAA (Figura 24). Hem observat que el receptor EP4 s'expressa majoritàriament en els microvasos (MVEC) i en alguns leucòcits infiltrants. Concretament en les mostres de teixit de NA veiem que el receptor EP4 s'expressa en les cèl·lules endotelials de microvasculatura de la capa adventícia limitant els microvasos (Figura 24 NA). En les mostres d'AAA veiem l'expressió del receptor EP4 per una banda en els microvasos i per l'altra banda en els leucòcits infiltrants (Figura 24 AAA).

Les VSMC de la capa mitjana no expressen l'EP4 ni en les mostres de NA ni en les mostres d'AAA (Figura 24 NA MITJANA i Figura 24 AAA MITJANA respectivament).



**Figura 24. NA.** Immunohistoquímica pel receptor EP4 en mostres control on podem veure absència d'expressió de l'EP4 en la capa mitjana de l'aorta (**NA MITJANA**); les fletxes indiquen algunes cèl·lules tenyides en els microvasos de la capa adventícia del vas de mostres de **NA( MVEC)**. **AAA.** Immunohistoquímica pel receptor EP4 en mostres d'AAA; les fletxes indiquen algunes cèl·lules tenyides en la microvasculatura de la capa adventícia i en leucòcits infiltrants (**AAA MVEC I LEUCÒCITS**), i absència d'aquest receptor en la capa mitjana (**AAA MITJANA**).

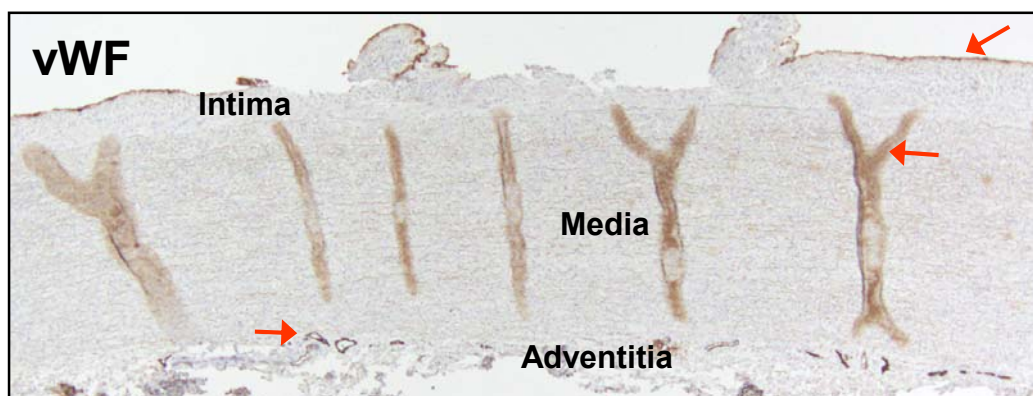
Aquets resultats són coherents amb els resultats obtinguts dels cultius cel·lulars de la Figura 21 on hem vist que els nivells d'mRNA del receptor EP4 són especialment abundants en cultius de MVEC.

### 5.3 ANÀLISI DE LA VASCULARITZACIÓ EN L'AAA

#### 5.3.1 IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND COM A MARCADOR DE CÈL·LULES ENDOTELIALS EN MOSTRES DE NA I D'AAA

Per tal de caracteritzar la vascularització en l'AAA i poder determinar el grau d'implicació de la via de la PGE<sub>2</sub> hem fet immunohistoquímica tenyint les cèl·lules endotelials amb un anticòs específic, el factor de von Willebrand (vWF, *von Willebrand Factor*), en mostres de teixit de NA i d'AAA.

En les mostres de NA observem microvasos que s'originen en la capa adventícia amb una distribució regular, travessen la capa mitjana i finalitzen en la capa íntima, algun d'ells després de ser bifurcats. Delimitant el vas aòrtic amb el lumen trobem tincions de cèl·lules endotelials de macrovasculatura. La presència de microvasculatura en la capa mitjana és escassa (Figura 25).



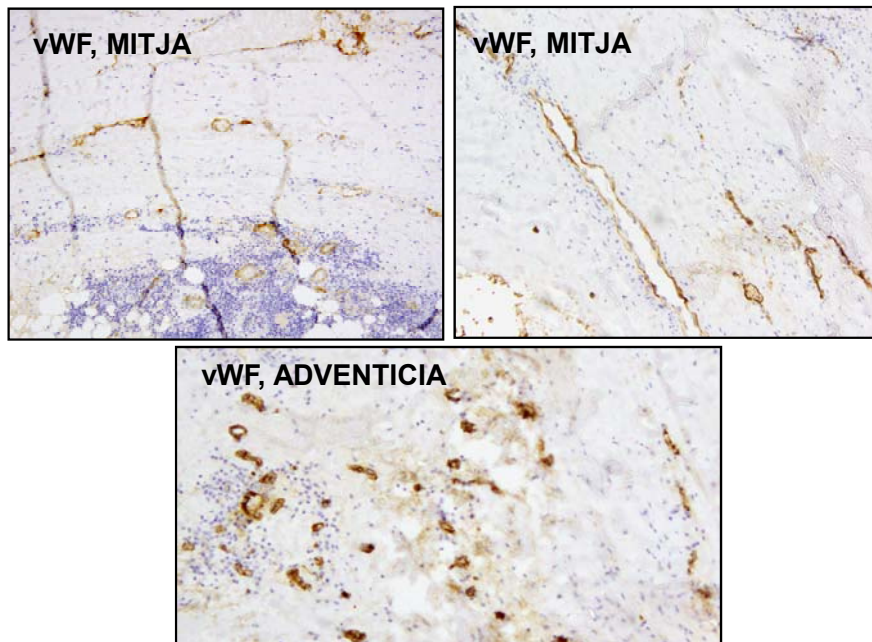
**Figura 25.** Exemple de tinció específica per immunohistoquímica pel marcador de cèl·lules endotelials vWF en una mostra de NA; les fletxes indiquen algunes cèl·lules endotelials tenyides.

En la capa mitjana de les mostres control, a més de la microvasculatura radial, observem de forma ocasional alguns microvasos en sentit longitudinal (Figura 26).



**Figura 26.** Exemple de tinció específica pel vWF de la capa mitjana del vas aòrtic; la fletxa ens localitza un tipus de microvascularització longitudinal. En la part superior trobem tincions de cèl·lules endotelials de l'íntima (macrovasculatura).

En les mostres d'AAA, la capa íntima és sovint eliminada i normalment no és visible. La microvasculatura de les mostres d'AAA és abundant en la capa adventícia i en la mitjana. En la Figura 27 es mostren varis exemples d'immunohistoquímica de vWF on es pot apreciar un gran nombre de vasos tant en sentit radial com longitudinal.



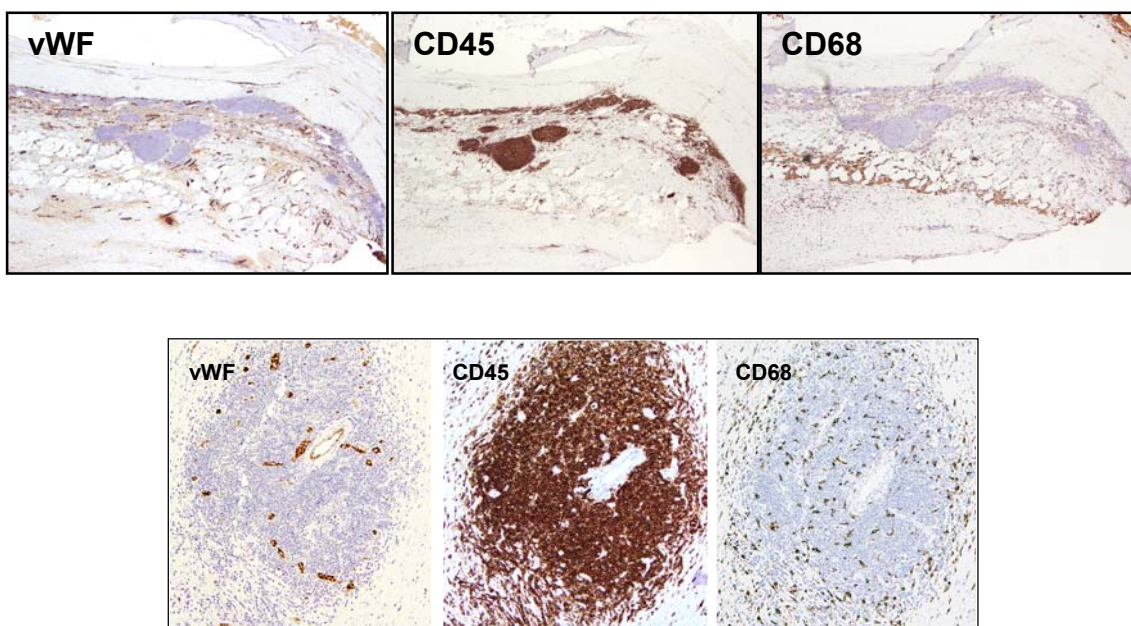
**Figura 27.** Exemple de tinció del marcador d'EC vWF de la capa mitjana (superior) i de la capa adventícia (inferior) de teixit vascular aòrtic de mostres d'AAA.

En les mostres de teixit aneurismàtic s'evidencia un augment en la capil·larització del teixit aòrtic.

### 5.3.2 IMMUNOHISTOQUÍMICA DE CD45 I CD68 COM A MARCADORS D'INFILTRACIÓ LEUCOCITÀRIA I MACRÒFAGS EN MOSTRES D'AAA

La Figura 28 mostra un exemple de talls seriats en què s'han realitzat tincions específiques de vWF, i de marcadors específics de leucòcits en general (CD45) i de macròfags (CD68). Com podem veure tenim concentrada la major part dels leucòcits infiltrants al voltant dels microcapil·lars de la capa adventícia i mitjana (Figura 28 CD45) però també trobem cèl·lules tenyides repartides per tota la capa mitjana sense formar agregats (Figura 28 CD68). La tinció amb anti-CD68 mostra que els macròfags estan més repartits per tot el teixit i que la seva

presència en els grans agregats leucocitaris perivasculars és proporcionalment escassa.



**Figura 28.** Dos exemples de tinció específica sobre la capa mitjana pels marcadors vWF d'EC, CD45 de leucòcits en general i CD68 de macròfags sobre una mateixa mostra de teixit d'AAA.

Pensem que la resta de leucòcits que no s'han tenyit amb el CD68 i sí que ho han fet amb el CD45 podrien ser limfòcits agregats, tot i que no hem fet tincions específiques per limfòcits. També podrien ser neutròfils però hem vist que els nivells d'mRNA de l'elastasa-2, típica dels neutròfils, està molt poc expressada en les nostres mostres d'AAA (resultats no mostrats).

El fet que trobem els leucòcits en la perifèria dels microvasos suggereix que la hipervascularització de l'aorta és un determinant de la infiltració leucocitària de l'AAA.

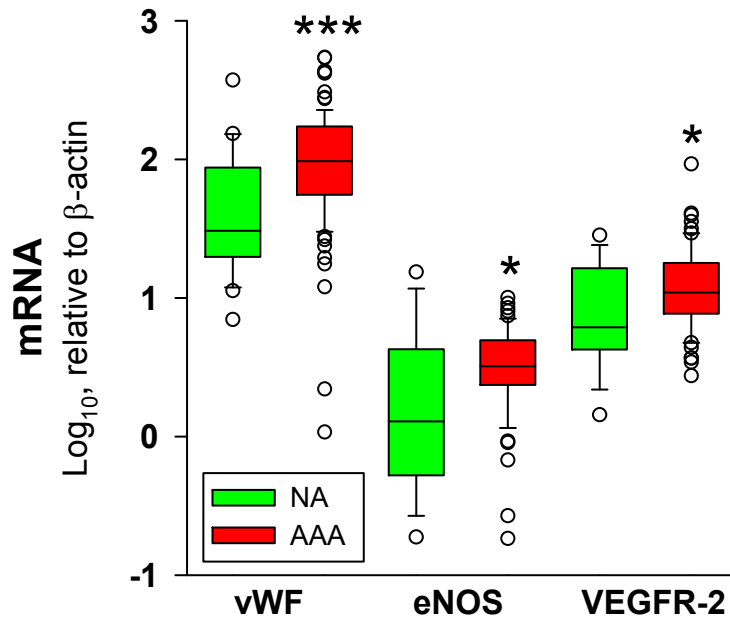
Aquestes cèl·lules del sistema immunològic amplificarien el procés inflamatori i la pròpia hipervascularització mitjançant l'alliberació de factors proangiogènics [14].

Quedaria per determinar si la PGE<sub>2</sub>, directament a través del receptor EP4, o bé a través de l'EP4 el qual estimula la síntesi i alliberació de factors proangiogènics, és un factor rellevant en l'activació de l'angiogènesi i, si aquest procés d'angiogènesi és previ al procés inflamatori màxim que desenvolupa l'AAA.

### 5.3.3 NIVELLS D'mRNA DE MARCADORS DE CÈL·LULES ENDOTELIALS EN MOSTRES DE NA I D'AAA

Un augment del procés d'angiogènesi implica un augment proporcional de la quantitat de les MVEC. Per poder quantificar aquest augment s'han determinat els nivells d'mRNA de dos marcadors de cèl·lules endotelials, el vWF i l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) que els utilitzarem com a índex de vascularització. També s'han analitzat els nivells d'expressió del receptor de VEGF (VEGF-receptor-2 o VEGFR2), que és abundantment expressat en cèl·lules endotelials.

Els resultats de l'expressió d'aquests marcadors no segueixen una distribució normal. Els resultats de la Figura 29 mostren que els nivells d'mRNA dels tres marcadors estan significativament augmentats en les mostres d'AAA.



**Figura 29.** Nivells d'expressió de marcadors de cèl·lules endotelials en mostres de NA (n=25) i en mostres d'AAA (n=86); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 quan es compara amb el grup de NA.

El fet que tots els nivells d'mRNA dels marcadors d'EC estiguin augmentats en les mostres d'AAA respecte les mostres de NA és coherent amb la hipervascularització observada en les mostres d'AAA.

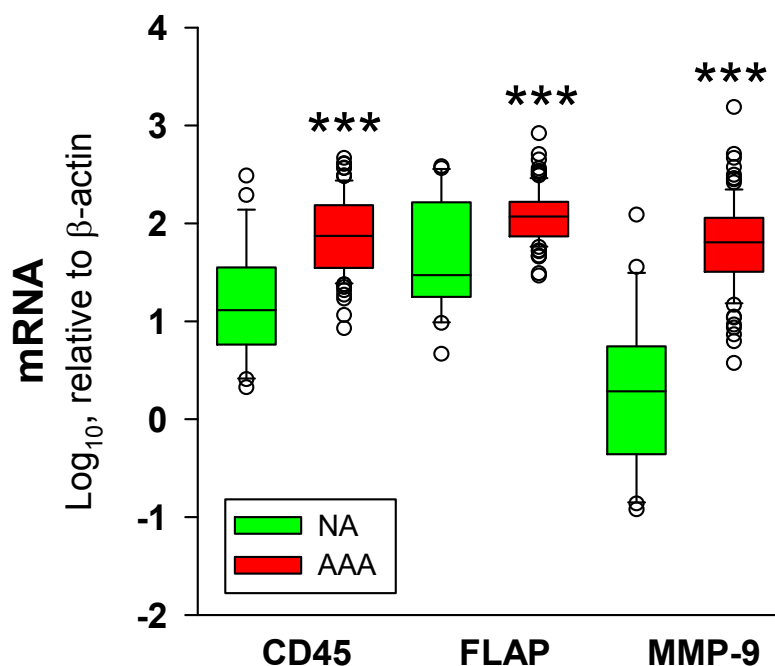


## 5.4 DESENVOLUPAMENT DE L'AAA. SÍNTESI I EFECTE DE LA PGE<sub>2</sub> EN LES CÈL·LULES DEL PARÈNQUIMA DE TEIXIT AÒRTIC

### 5.4.1 NIVELLS D'mRNA DE MARCADORS DE LEUCÒCITS EN MOSTRES DE NA I D'AAA

Per tal d'ubicar el procés inflamatori i el procés d'angiogènesi dins del desenvolupament de l'AAA hem mesurat l'expressió de diferents marcadors de leucòcits que caracteritzen el procés inflamatori.

Per determinar aquest augment de la infiltració leucocitària s'han analitzat els nivells d'mRNA de CD45, FLAP (marcadors de leucòcits indetectables en EC en cultiu) i MMP-9, una metal·loproteïnasa molt expressada pels leucòcits. Trobem molt expressats tots aquest marcadors en les mostres d'AAA (Figura 30).



**Figura 30.** Nivells d'mRNA dels marcadors de leucòcits en mostres de NA (n=25) i en mostres d'AAA (n=86); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%; \*\*\*p<0.001 quan els comparem amb NA.

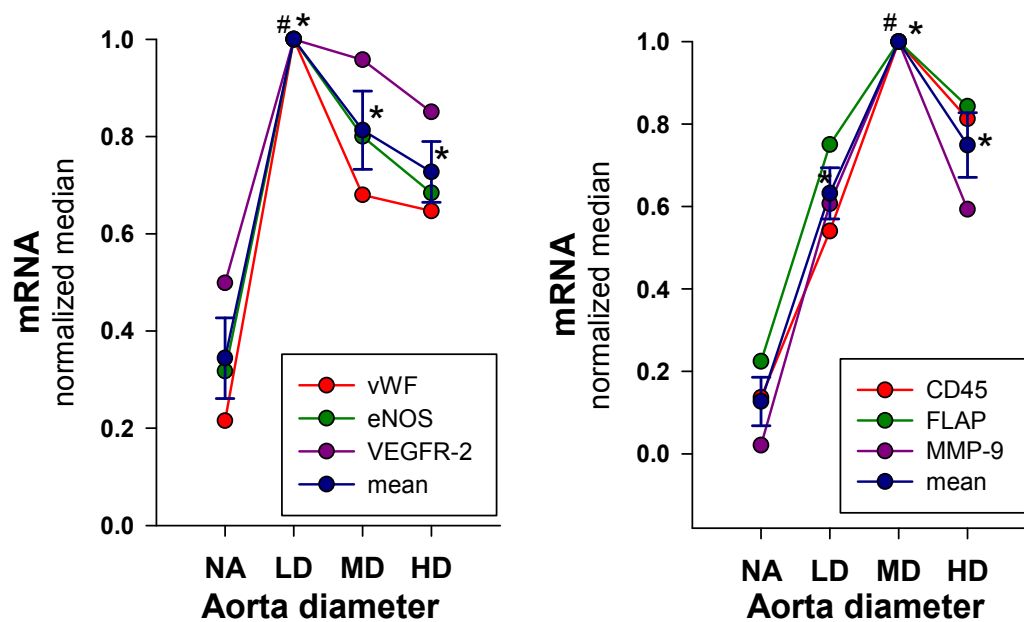
Per aquest motiu podem afirmar que en les mostres d'AAA hi ha un clar augment dels nivells de leucòcits en la capa adventícia i mitjana vascular coherent amb els resultats de la immunohistoquímica (Figura 28). Aquest augment de leucòcits infiltrants ve acompanyat d'un augment de la resposta inflamatòria *in situ* [14].

#### 5.4.2 CORRELACIÓ DELS MARCADORS D'EC I MARCADORS DE LEUCÒCITS EN ELS DIFERENTS ESTADIS DE LA MALALTIA

Un dels nostres objectius és determinar quin dels dos processos, inflamació o angiogènesi, es desenvolupa en primer lloc i dona pas a l'altre en el transcurs de l'AAA.

Per fer-ho hem estratificat els pacients en tres grans grups en funció del diàmetre de l'aorta: NA (*normal aorta*), controls; LD (*low diameter*), <55mm; MD (*moderate diameter*), 55-69.9mm; HD (*high diameter*), ≥70mm. D'aquesta manera tenim una aproximació de tres estadis del desenvolupament de la malaltia (inicial: LD, mig: MD i avançat: HD).

Un cop feta l'estratificació hem representat els valors d'mRNA dels diferents marcadors d'EC i de leucòcits en funció del diàmetre de l'aorta (Figura 31). En relacionar els resultats dels nivells d'mRNA dels diferents marcadors d'EC amb els diferents diàmetres de l'aorta veiem que es produeix ja el màxim dels seus nivells d'mRNA en el grup LD. Mentre que la gràfica que relaciona els nivells d'mRNA dels marcadors de leucòcits amb el diàmetre de l'aorta mostra el màxim dels seus nivells d'mRNA en el grup MD. Els dos grups mostren una disminució dels seus nivells d'mRNA en els estadis avançats (HD).



**Figura 31.** Nivells d'expressió de marcadors d'EC (esquerra) i leucòcits (dreta) en funció del diàmetre de l'aorta dels pacients d'AAA. L'estratificació de pacients s'ha realitzat en funció del diàmetre de l'artèria aorta (NA, n=25; LD<55mm, n=14; MD 55-69.9mm, n=37; i HD≥70mm, n=35; \*p<0.05 comparat amb els valors d'aorta normal i #p<0.05 quan es compara amb els pacients d'altres grups.

Observem que en estadis més prematurs (LD) de la malaltia s'expressen majoritàriament els marcadors d'EC, per tant podem afirmar que en un primer estadi de l'AAA ja es produeix una activació de l'angiogènesi.

Els nivells d'mRNA de marcadors de leucòcits mostren un màxim en el grup MD. Aquests resultats són coherents amb altres treballs que mostren nivells màxims de les proteïnases en l'AAA [133,136] en el grup MD. Podem dir que s'arriba la màxima infiltració leucocitària posteriorment a l'angiogènesi.

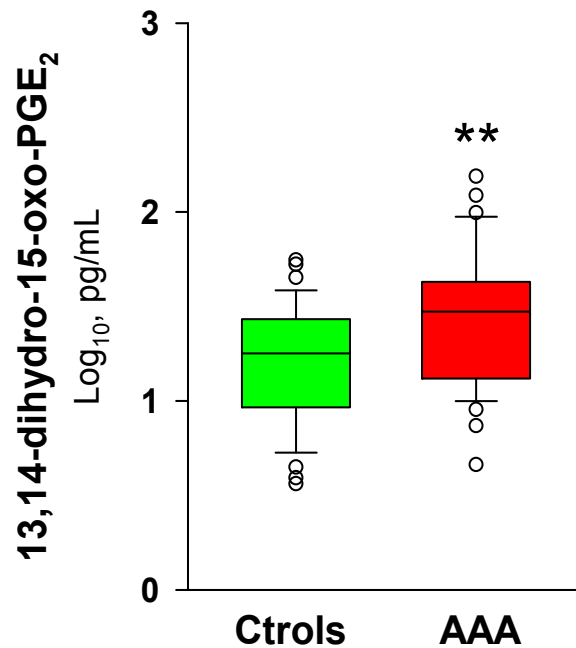
Tal i com hem vist en els resultats d'immunohistoquímica, aquesta hipervascularització s'inicia en la capa adventícia i genera microvasos cap a la

capa mitjana. Creiem que el procés d'hipervascularització de la paret aòrtica facilita l'entrada de leucòcits en el teixit vascular. Aquesta infiltració leucocitària activa un procés inflamatori que acaba degradant el mur vascular [14,16,18]. Amb aquests resultats arribem a la conclusió que en els primers estadis de l'AAA s'activa un procés d'angiogènesi que facilita un posterior procés d'inflamació. Quedaria per determinar quin efecte té la PGE<sub>2</sub> alliberada en aquest procés inflamatori sobre l'angiogènesi, a través de quins receptors actua i sobre quins tipus cel·lulars ho fa.

#### 5.4.3 NIVELLS PLASMÀTICS DE METABÒLITS DE LA PGE<sub>2</sub> I EXPRESSIÓ DELS ENZIMS DE LA BIOSÍNTESI DE LA PGE<sub>2</sub> EN MOSTRES D'AAA ESTRATIFICADES EN FUNCIÓ DEL DIÀMETRE DE L'AORTA

Una de les nostres hipòtesis es basa en el fet que la PGE<sub>2</sub> activa el procés de l'angiogènesi a través del receptor EP4 [131,132,137-141]. Hem vist que aquest procés és cabdal perquè les cèl·lules del sistema inflamatori puguin arribar al teixit vascular. Però per altra banda la hipervascularització debilita mecànicament la paret de l'aorta perquè la torna "esponjosa" degut als propis microvasos i als enormes agregats limfocitaris perivasculars.

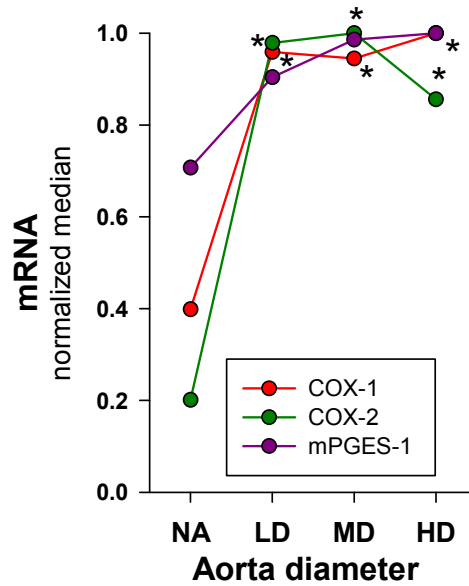
Com que la PGE<sub>2</sub> és ràpidament degradada *in vivo* [89,142] nosaltres hem analitzat els nivells dels seus metabòlits (13,14-dihidro-15-oxo-metabòlits) en plasma. Com es pot veure, (Figura 32) els nivells circulants dels metabòlits de la PGE<sub>2</sub> són significativament més elevats en els pacients amb AAA comparats amb els pacients control.



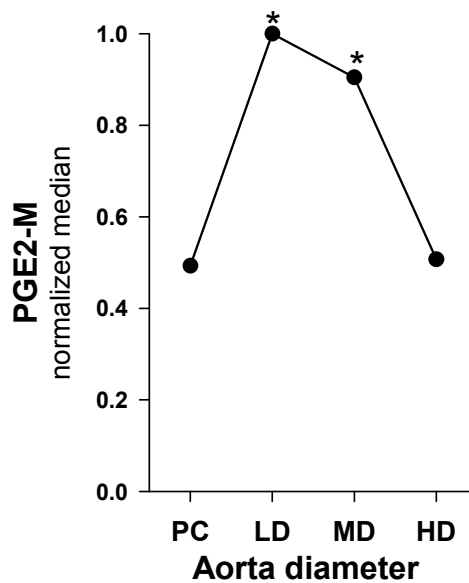
**Figura 32.** *Nivells plasmàtics dels metabòlits de la PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>M) de pacients control (n=39) i de pacients amb AAA (n=39); la caixa ens indica els percentils 25 i 75% i la línia horitzontal, la mitjana. Els punts oberts ens indiquen alguns valors que es troben fora dels percentils 10 i 90%; \*\*p<0.01 quan comparem amb el control.*

Els resultats ens indiquen que la biosíntesi de PGE<sub>2</sub> està incrementada en l'AAA.

Hem quantificat els nivells d'mRNA dels diferents enzims involucrats en la síntesi de la PGE<sub>2</sub> (Figura 33) i els nivells de PGE<sub>2</sub>M circulants (Figura 34) en funció dels diferents grups de pacients estratificats segons el diàmetre de l'aorta.



**Figura 33.** Mitjana dels nivells d'mRNA de la COX-1, COX-2 i mPGES-1 (NA, n=25; LD<55mm, n=14; MD 55-69.9mm, n=37; i HD≥70mm, n=35) normalitzada al valor més elevat dels diferents grups estratificats en funció del diàmetre de l'aorta. \*p<0.05 quan els comparem amb els valors de les mostres NA.

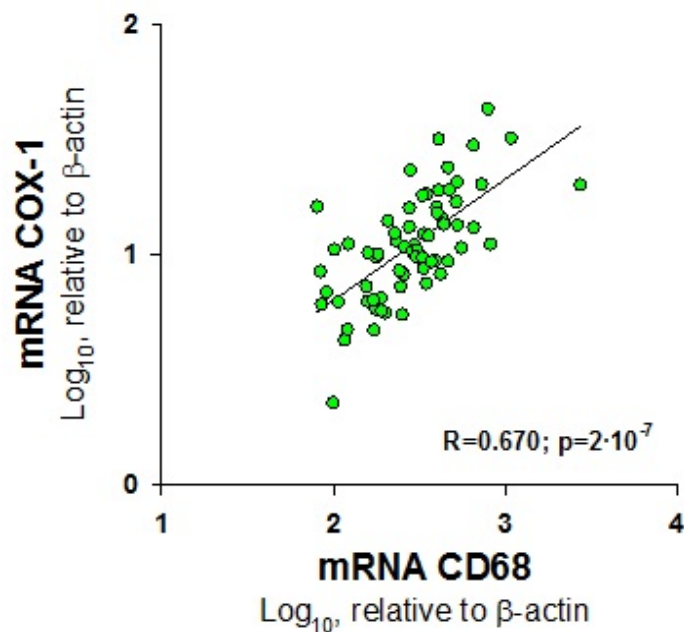


**Figura 34.** Mitjana dels nivells de PGE<sub>2</sub>M circulants en plasma (plasma controls (PC), n=39; LD<55mm, n=7; MD 55-69.9mm, n=21; i HD≥70mm, n=11) normalitzada al valor més elevat dels diferents grups estratificats en funció del diàmetre de l'aorta. \*p<0.05 quan els comparem amb els valors dels controls (PC).

Els resultats ens mostren que en el grup LD es produeix un augment important dels enzims i metabòlits de la PGE<sub>2</sub> mentre que en la resta de grups més avançats, aquests es mantenen. Hem de tenir en compte que la mesura dels nivells plasmàtics de la PGE<sub>2</sub> és un reflex de la biosíntesi sistèmica i que d'altres teixits poden contribuir-hi.

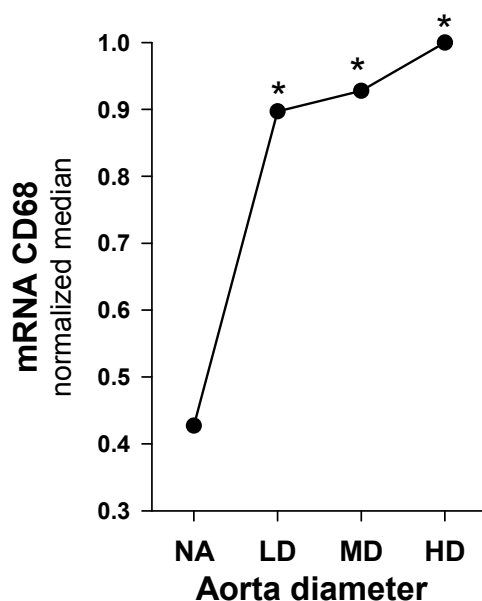
Com ja hem dit la COX-1 és un enzim constitutiu i no induïble. El fet de que el trobem augmentat en l'AAA és poc provable que sigui degut a una *up-regulation* de la seva expressió. Hem estudiat la correlació entre els nivells de COX-1 i els dels diferents marcadors cel·lulars. L'única correlació rellevant que s'ha trobat entre els nivells de COX-1 i de CD68 que es mostren a la Figura 35. Aquests resultats suggereixen que l'increment de COX-1 en l'AAA és degut fonamentalment a l'aportació dels macròfags que s'infiltra en el teixit aneurismàtic.





**Figura 35.** Correlació entre els nivells d'mRNA de la COX-1 i els nivells d'mRNA del marcador de macròfags CD68 en mostres d'AAA (n=86, correlació de Pearson).

Contràriament la COX-2 i l'mPGES-1, a més d'estar incrementades en l'AAA, la seva variació no es correlaciona amb la variació de cap marcador en concret. Per immunohistoquímica hem vist que la COX-2 i l'mPGES-1 s'expressen en les cèl·lules vasculars i també en els leucòcits. Tot plegat fa pensar que el fet que l'increment d'aquests enzims en l'AAA és degut a una *up-regulation* de la seva expressió. A més, a on en major probabilitat es pot donar aquesta inducció de l'expressió és en les cèl·lules vasculars EC i VSMC degut a l'acció de citokines proinflamatòries com la IL-1 $\beta$  en gran mesura alliberades per els propis macròfags presents des de les etapes primerenques del desenvolupament de l'AAA, com mostra la Figura 36.



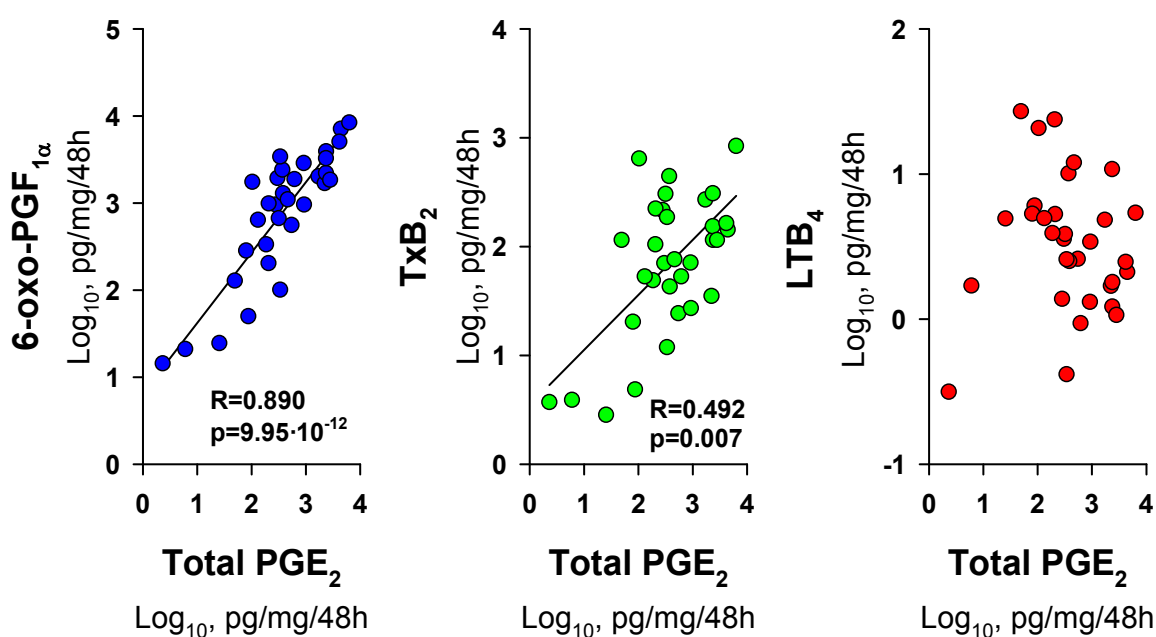
**Figura 36.** Mitjana dels nivells d'mRNA de la CD68 (NA, n=25; LD<55mm, n=14; MD 55-69.9mm, n=37; i HD≥70mm, n=35) normalitzada al valor més elevat dels diferents grups estratificats en funció del diàmetre de l'aorta. \*p<0.05 quan els comparem amb els valors de les mostres NA.

El fet que la maquinària biosintètica de la PGE<sub>2</sub> (COX-2/mPGES-1) es trobi incrementada en l'AAA suscita la qüestió de quins tipus cel·lulars són els responsables majoritaris de la seva síntesi. Per identificar quins tipus cel·lulars són els que produeixen PGE<sub>2</sub> hem correlacionat els nivells totals de PGE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>+PGE<sub>2</sub>M) alliberada per mostres de teixit aneurismàtic amb l'alliberament d'altres icosanoides específics de tipus cel·lulars presents en les lesions d'AAA.

Hem correlacionat els nivells de la PGE<sub>2</sub> amb els nivells alliberats de PGI<sub>2</sub> (analitzada com a 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>) que se sintetitza bàsicament en cèl·lules musculars, endotelials i fibroblasts.

També hem correlacionat els nivells de PGE<sub>2</sub> alliberada amb els nivells de TxB<sub>2</sub> (sintetitzat per leucòcits: monòcits/macròfags) i amb els nivells de LTB<sub>4</sub> (sintetitzat per leucòcits: neutròfils).

Els resultats mostren només una bona correlació entre els nivells de PGE<sub>2</sub> i 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> (Figura 37).



**Figura 37.** Correlació entre els nivells de PGE<sub>2</sub> total (PGE<sub>2</sub>+PGE<sub>2</sub>M) alliberada per mostres d'AAA i PGI<sub>2</sub> (en termes del seu metabòlit més estable 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>) o TXA<sub>2</sub> (en termes del metabòlit més estable TxB<sub>2</sub>) o LTB<sub>4</sub> (n=32, correlació de Pearson).

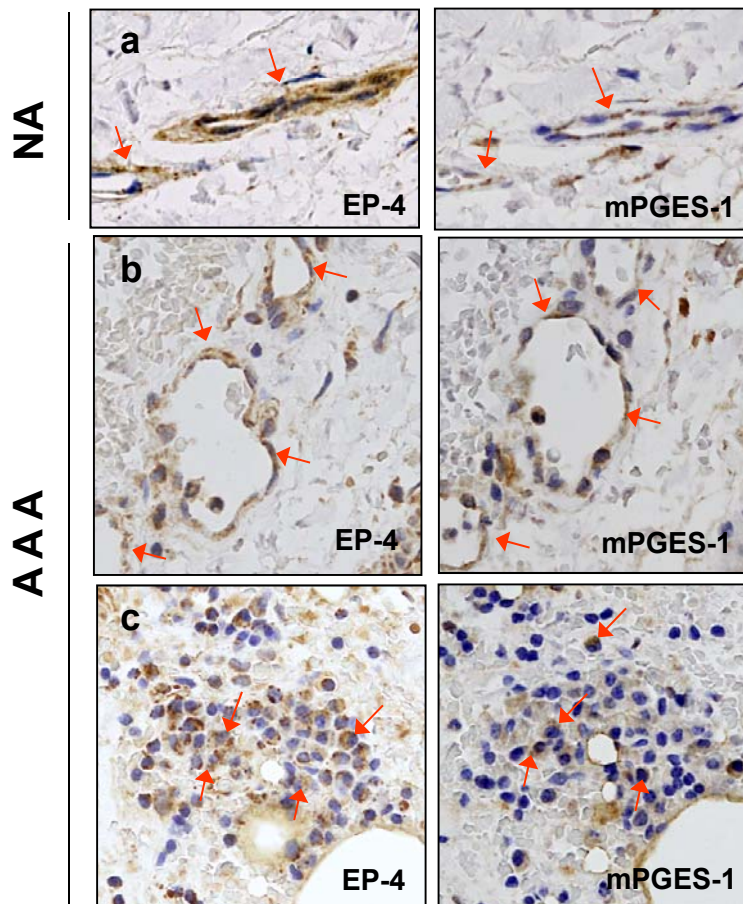
Aquests resultats ens indiquen que la variació en la síntesi de PGE<sub>2</sub> entre les mostres d'AAA es correlaciona fonamentalment amb la variació de la producció de PGI<sub>2</sub>. La PGI<sub>2</sub> es produeix exclusivament en les cèl·lules vasculares ja que són les úniques que expressen la PGI-sintetasa. Tenint en compte que el

nombre de VSMC està força disminuït en l'AAA, la contribució de les EC en la biosíntesis de PGE<sub>2</sub> pot ésser molt important amb una funció bàsicament autocrina. A més, els resultats referents a l'expressió de la 15-PGDH suggereixen que la degradació de la PGE<sub>2</sub> es produeix més ràpidament en els leucòcits perquè les cèl·lules vasculares no expressen aquest enzim de forma notable. Aquests resultats no descarten el paper dels macròfags en la producció de PGE<sub>2</sub> en l'AAA. De fet, s'ha vist que la PGE<sub>2</sub> derivada de la COX-2 en els macròfags és important en la patogènesi i ruptura de l'AAA [106,107,143,144].

#### 5.5 ACOBLAMENT FUNCIONAL DELS ENZIMS BIOSINTÈTICS DE LA PGE<sub>2</sub> AMB EL RECEPTOR EP4 EN LES CÈL·LULES ENDOTELIALS

Hem estudiat la colocalització del receptor EP4 i de l'mPGES-1 en el teixit vascular. Per fer-ho hem treballat amb anticossos específics pel receptor EP4 i l'mPGES-1 sobre mostres de NA i d'AAA en talls seguits. Els resultats de la Figura 38 il·lustren que tant en les mostres de NA com en les d'AAA, l'mPGES-1 i el receptor EP4 es coexpressen en la microvasculatura (MVEC) (Figura 38a i 38b, respectivament); i en les mostres d'AAA tant el receptor EP4 com l'mPGES-1 també es coexpressen en alguns leucòcits infiltrants (Figura 38c).

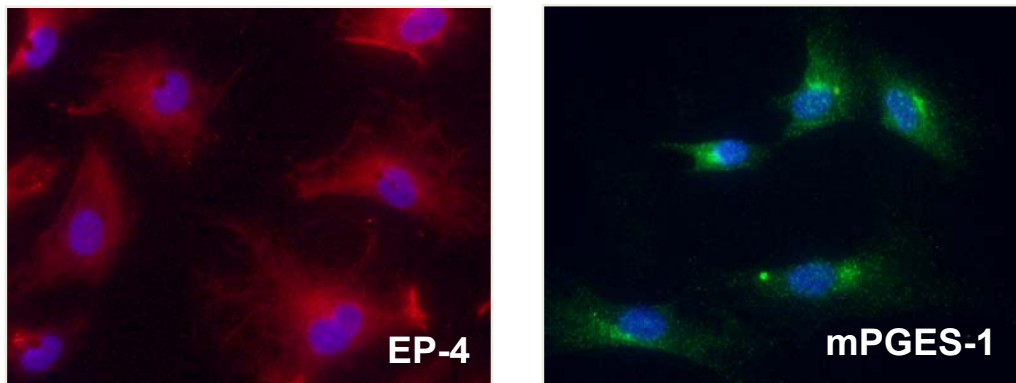
El receptor EP4 no s'expressa en les cèl·lules de la capa mitjana (VSMC) ni en les mostres control ni en les d'AAA.



**Figura 38.** *Imatges representatives de seccions serials que mostren la coexpressió del receptors EP4 i l'mPGES-1 en mostres de microvascularura de teixit de NA i d'AAA; les fletxes indiquen algunes cèl·lules endotelials tenyides de NA (a), la coexpressió del receptor EP4 i l'mPGES-1 en cèl·lules de microvascularura en mostres de teixit d'AAA (b) i en zones d'infiltració leucocitària (c).*

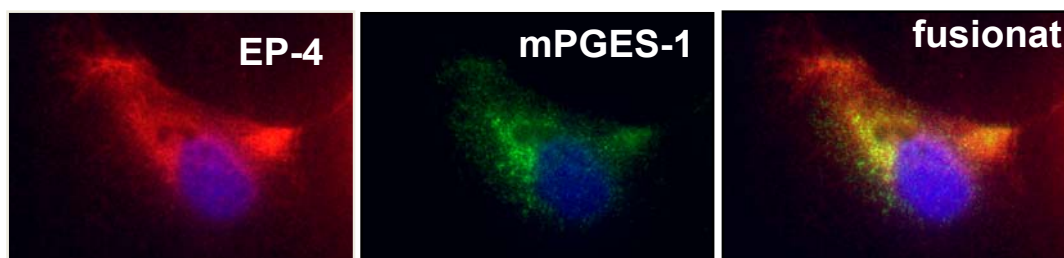
Per tant, la PGE<sub>2</sub> produïda per les MVEC probablement interacciona amb el receptor EP4 que s'expressa en les mateixes cèl·lules de forma autocrina.

A la Figura 39 es mostren exemples d'experiments d'immunofluorescència sobre cultius de MVEC pel receptor EP4 i l'mPGES-1. Es pot observar que l'EP4 s'expressa en la membrana plasmàtica mentre que l'mPGES-1 s'expressa en el reticle endoplasmàtic, en l'aparell de Golgi i en la coberta nuclear.



**Figura 39.** Resultats de la immunofluorescència de cèl·lules endotelials microvasculars en cultiu pel receptor EP4 i l'mPGES-1.

La Figura 40 mostra un exemple de doble tinció EP4/mPGES-1 en què es pot observar la coexpressió de les dues proteïnes en una mateixa cèl·lula endotelial microvascular.



**Figura 40.** Resultats de la doble immunofluorescència pel receptor EP4 i de l'mPGES-1.

Aquests resultats recolzen el concepte de l'efecte autocrí de la PGE<sub>2</sub> sobre aquest tipus cel·lular. Com hem mencionat, en els leucòcits també hem vist que s'expressa l'mPGES-1 per tant també generen PGE<sub>2</sub>. Tot i així, els leucòcits també expressen abundantment la 15-PGDH que la degrada, la qual cosa ens fa pensar que la quantitat més important de PGE<sub>2</sub> que actua sobre les MVEC és la sintetitzada per les mateixes MVEC.

Hem vist que la variació en la producció de la PGE<sub>2</sub> en les mostres d'AAA es correlaciona fonamentalment amb la producció de PGI<sub>2</sub> la qual cosa indica un paper important de les cèl·lules vasculares en la seva biosíntesi (Figura 37). Creiem que la PGE<sub>2</sub> té un paper rellevant en la formació de nous capil·lars.

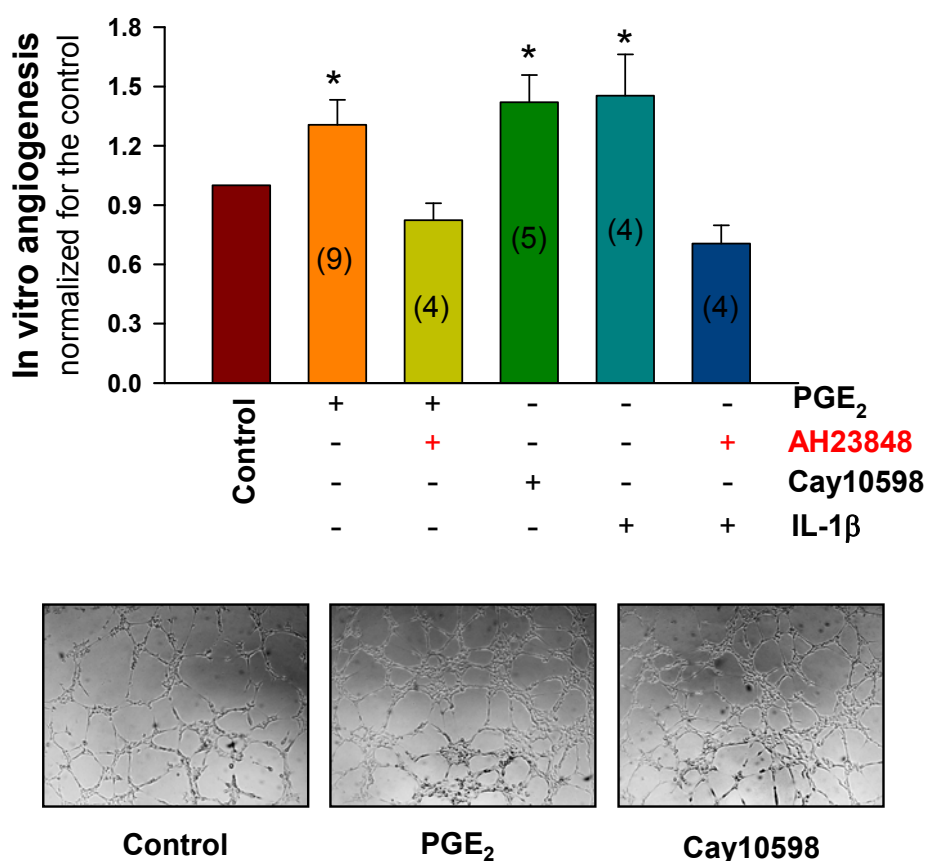
El receptor EP4 s'expressa majoritàriament en les MVEC (Figura 24). Faltaria doncs, comprovar que efectivament l'angiogènesi regulada per la PGE<sub>2</sub> és dependent de l'EP4.

#### 5.6 ESTUDI DE L'ANGIOGÈNESI *IN VITRO* EN RESPOSTA A LA PGE<sub>2</sub> EN CULTIUS DE MVEC

Hem treballat amb cultius de MVEC. Els resultats de la Figura 41 mostren que s'indueix l'angiogènesi *in vitro* quan les MVEC s'incuben amb PGE<sub>2</sub> exògena. S'obté un efecte similar en incubar cultius de MVEC amb agonista sintètic de l'EP4 Cay10598. Els dos efectes són inhibits fins al nivell dels controls en realitzar els experiments en presència de l'antagonista de l'EP4 AH23848. Aquests resultats indiquen que efectivament la inducció de l'angiogènesi per la PGE<sub>2</sub> exògena està mediada per l'EP4.

La següent qüestió és explorar si la PGE<sub>2</sub> d'origen endogen pot també induir angiogènesi i si es produeix a través de l'EP4. Com ja sabem, la PGE<sub>2</sub> es sintetitza en situacions inflamatòries [75]. Concretament durant el procés d'inflamació s'alliberen diferents mediadors com la IL-1 $\beta$  que indueixen la formació d'aquesta prostaglandina.

S'han incubat, doncs, les cèl·lules amb IL-1 $\beta$  recombinant humana que ja se sap que indueix la mobilització de l'àcid araquidònic i l'expressió de la COX-2/mPGES-1 [145]. Els resultats de la Figura 41 mostren que la IL-1 $\beta$  indueix la formació de túbuls *in vitro* i també en aquest cas l'AH23848 n'antagonitza l'efecte.



**Figura 41.** Efecte de l'activació de l'angiogènesi a través del receptor EP4 a nivell *in vitro*. MVEC s'incuben en plaques de 96 pous amb 10 nmols/L de PGE<sub>2</sub> o Cay10598 (agonista de l'EP4). Per tal de bloquejar aquest efecte s'incuben 200 nmols/L d'AH23848 (antagonista del receptor EP4). Pels assajos amb IL-1 $\beta$ , les cèl·lules són preincubades o no durant 1h amb IL-1 $\beta$  humana recombinant (50U/mL) abans de ser sembrades en la placa de 96 pous. Després de 4h de tractament, es fan fotografies dels cultius i un comptatge de les estructures cel·lulars tancades en cercles. Les columnes representen la mitja $\pm$ SEM (expressada en relació als valors del control). Dins de les columnes s'indiquen el nombre d'experiments realitzats per triplicat. En la part inferior trobem les fotografies representatives dels experiments. \* $p < 0.05$ , en comparar-los amb els controls.



Per una banda veiem com la PGE<sub>2</sub> exògena indueix l'angiogènesi i per l'altra veiem que la IL-1 $\beta$  també. El fet que antagonistes del receptor EP4 inhibeixin l'efecte tant de la PGE<sub>2</sub> exògena com de la PGE<sub>2</sub> endògena, i a més l'agonista de l'EP4 Cay105948 indueix la formació de túbuls *in vitro* de forma similar a la PGE<sub>2</sub>, suggereix que l'angiogènesi induïda per la PGE<sub>2</sub> *in vivo* pot produir-se de forma autocrina a través del receptor EP4.

Com a conseqüència d'aquests resultats ens apareixen dues possibilitats: la primera és que la PGE<sub>2</sub> activa l'angiogènesi directament a través del receptor EP4, i la segona és que l'activació del receptor EP4 indueix l'expressió d'aquests factors de creixement i aquests, l'angiogènesi.

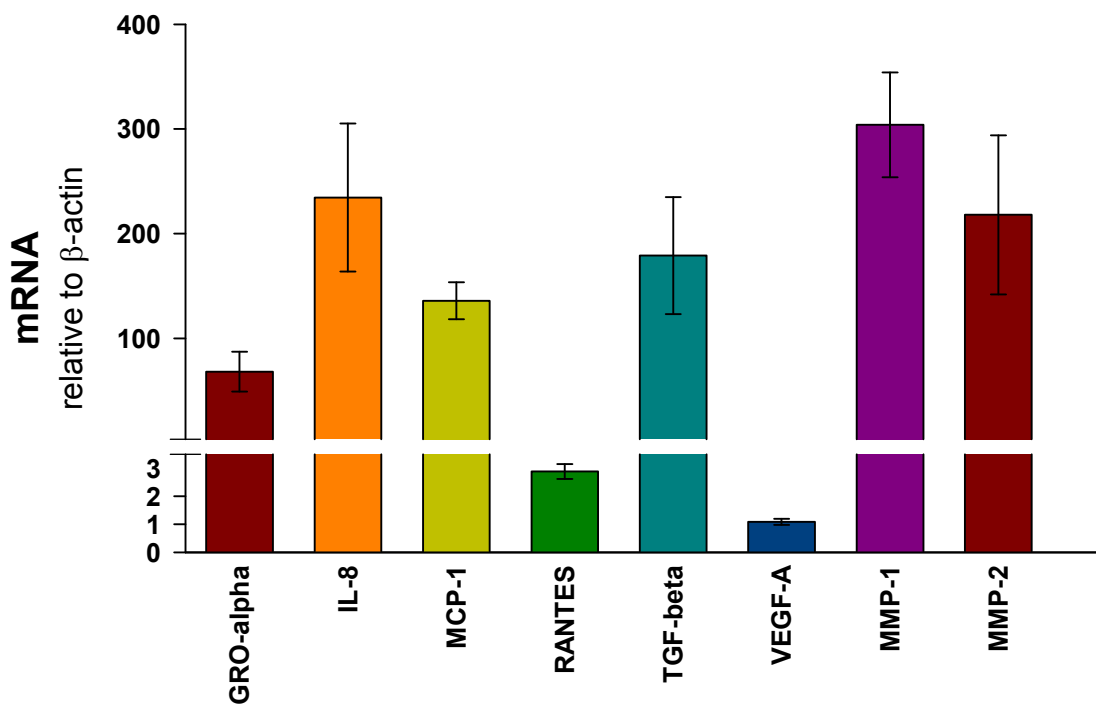
S'han estudiat doncs l'expressió de factors proangiogènics coneguts en les mostres d'AAA i de NA. La Taula 2 mostra els resultats obtinguts. La majoria d'ells estan significativament incrementats en les mostres d'AAA quan es comparen amb les mostres de NA.

**Taula 2.** Nivells d'mRNA de factors proangiogènics de mostres d'AAA i de NA relatives a la  $\beta$ -actina (x1000).

Factor	AAA		NA		AAA/NA	P <sup>a</sup>
	Mitjana	percentil 25-75	Mitjana	percentil 25-75		
ENA-78	2.17	0.97-6.11	0.12	0.05-0.58	17.76	<0.001
GCP-2	0.08	0.04-0.14	0.02	0.01-0.04	5.62	<0.001
GRO $\alpha$	12.33	5.19-29.77	1.57	0.77-7.36	7.84	<0.001
IL-8	93.91	34.68-156.97	11.39	1.82-33.59	8.25	<0.001
MCP-1	212.88	120.44-338.41	155.29	60.09-	1.37	0.091
NAP-2	6.11	2.36-20.59	0.86	0.28-1.80	7.15	<0.001
RANTES	138.75	92.08-215.69	21.66	7.93-39.07	6.41	<0.001
TGF $\beta$	76.30	60.83-96.10	65.45	37.11-75.91	1.17	0.024
VEGF-A	31.77	22.11-60.64	20.32	10.81-44.25	1.56	0.020
MMP-1	2.79	1.10-7.53	0.14	0.02-0.43	20.04	<0.001
MMP-2	218.65	125.91-363.39	115.98	55.08-	1.89	<0.001
MMP-3	0.36	0.06-1.22	0.02	0.01-0.10	15.81	<0.001
MMP-9	64.00	33.02-113.35	1.92	0.44-5.35	33.26	<0.001
MMP-10	0.04	0.02-0.09	n.d.	-	-	<0.001
MMP-12	1.30	0.50-5.82	0.02	0.01-0.22	66.62	<0.001
MMP-13	0.39	0.12-1.17	0.01	0.004-0.02	56.75	<0.001

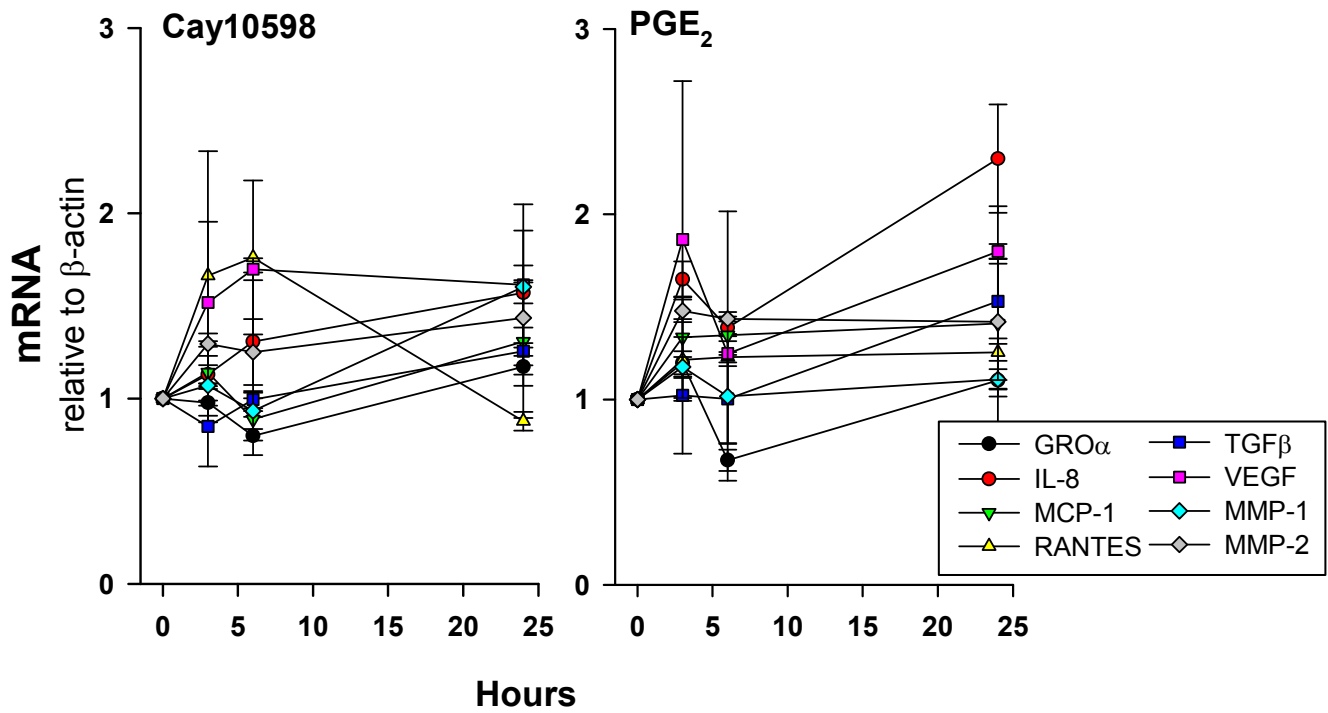
<sup>a</sup>Els resultats no segueixen una distribució normal i utilitzem el test Mann-Whitney Rank Sum per comparar les mostres d'AAA (n=86) i NA (n=25). (n.d) no detectat.

A continuació, s'ha explorat l'expressió d'aquests mateixos factors en cultius de MVEC. La Figura 42 mostra els nivells d'aquells que van ser detectables a nivell d'mRNA, GRO $\alpha$ , IL-8, MCP-1, TGF $\beta$ , MMP-1, MMP-2 VEGF-A i RANTES, sent els dos últims molt minoritaris.

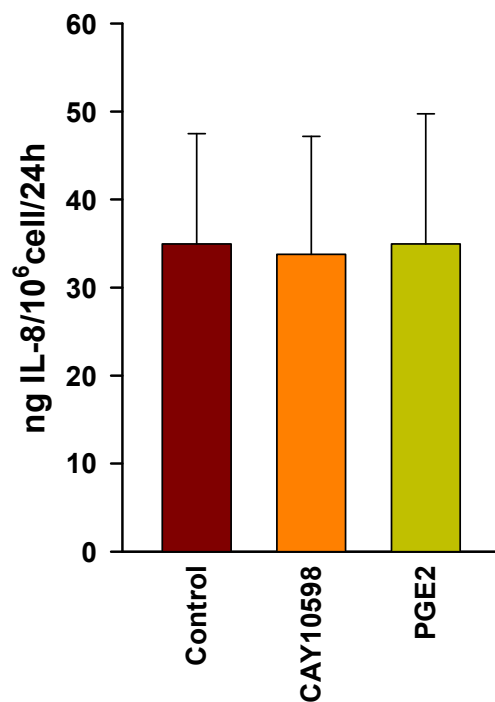


**Figura 42.** S'han analitzat aquells factors majoritaris incrementats en les mostres d'AAA. La gràfica mostra els nivells d'mRNA de factors proangiogènics relatius als valors de la  $\beta$ -actina de cada mostra (x100) analitzats en cultius de MVEC (n=4).

Posteriorment s'han tractat cultius de MVEC amb PGE<sub>2</sub> i Cay10598 durant 24 h i s'han analitzat els factors presents a la Figura 42. Els resultats representats en la Figura 43 mostren que únicament la IL-8 incrementa els nivells del transcrit de forma notable (>2 vegades) en resposta a la PGE<sub>2</sub>. S'han procedit a verificar els nivells d'IL-8 en termes de proteïna en el medi de cultiu. Els resultats de la Figura 44 mostren que el dèbil increment d'mRNA no es tradueix en un increment de proteïna després del tractament ni amb la PGE<sub>2</sub> ni amb l'agonista de l'EP4.



**Figura 43.** Time-course en cultius de MVEC dels nivells d'mRNA dels factors proangiogènics estimulats amb 1µmol/L de PGE<sub>2</sub> o bé amb Cay10598 (agonista EP4).



**Figura 44.** Nivells de proteïna IL-8 expressats en ng de proteïna/10<sup>6</sup> cèl·lules durant 24h d'incubació de cultius MVEC amb Cay10598 (agonista EP4) i PGE<sub>2</sub>.

Per tant, aquests resultats ens indiquen que l'angiogènesi induïda per la PGE<sub>2</sub> està mediada per l'EP4 directament i no per la inducció secundària d'altres factors proangiogènics.

## 5.7 DISCUSSIÓ FINAL

La PGE<sub>2</sub> és el prostanoide més rellevant produït per diferents teixits i el més important involucrat en la resposta inflamatòria [76,102]. Aquest és el primer estudi que analitza l'expressió de la via completa de la PGE<sub>2</sub> en mostres d'AAA humanes.

Els experiments d'immunohistoquímica pel marcador vWF sobre biòpsies d'aorta mostren notables diferències entre les mostres control i les d'AAA. Les mostres control es caracteritzen per una regular distribució de microvasculatura radial i per una presència de microvasculatura circumferencial en la capa mitjana poc rellevant. Contràriament, en les mostres d'AAA veiem una vascularització abundant (radial i paral·lela) entre les capes de VSMC de la capa mitjana. Trobem la major infiltració leucocitària la en zones perivasculars de la microvasculatura. D'acord amb estudis previs, veiem que en les mostres d'AAA es produeix una hipervascularització [11,12], i trobem un augment en l'expressió de marcadors d'EC que és consistent amb un augment de la vascularització de les mostres d'AAA comparades amb les de control.

En realitzar l'estratificació de les mostres d'AAA en funció del diàmetre de l'aorta veiem que els nivells màxims d'mRNA de marcadors d'EC els trobem en el grup LD, mentre que els marcadors utilitzats per estimar la infiltració leucocitària mostren un nivell màxim en el grup MD. Aquests resultats coincideixen amb resultats previs [136] que indiquen que la MMP-9 està molt expressada en mostres d'AAA de diàmetre moderat (MD). Aquestes observacions ens permeten formular la hipòtesi que l'angiogènesi precedeix a la resposta inflamatòria màxima en el desenvolupament de l'AAA. Aquest mateix concepte ja el suggereixen altres publicacions [136] que fan referència als nivells de les proteïnasses en l'AAA. El fet que els nivells dels marcadors d'EC disminueixen a mesura que augmenta el diàmetre de l'aorta suggereix que la reducció de la infiltració leucocitària, i per tant la reducció dels mediadors inflamatoris observats en les mostres d'AAA d'estadis avançats (HD), són degudes a una reducció de la vascularització. Conseqüentment, podem afirmar

que en estadis inicials de l'AAA l'angiogènesi afavoreix una posterior infiltració leucocitària.

Hem trobat que tant els nivells de la COX-2 com de la COX-1 estan augmentats en les mostres d'AAA. Hi ha dos factors que poden tenir influència en aquest augment: el primer és la possible *up-regulation* o *down-regulation* de l'expressió dels enzims, i l'altre és la diferent proporció de tipus cel·lulars que hi ha entre les mostres d'AAA i control. Com ja sabem la COX-1 és un enzim constitutiu i s'expressa ubiquament en tots els teixits [30,32,33]; per tant el seu increment és probablement degut a l'augment de les cèl·lules que l'expressen, com els macròfags i les MVEC. Els nostres resultats localitzen la COX-2 i la seva síntesi en les cèl·lules vasculars i en els leucòcits en les mostres d'AAA però una expressió molt dèbil en les mostres de NA, per tant podem pensar que la COX-2 està efectivament *up-regulated* en les cèl·lules vasculars de les mostres d'AAA incloses les MVEC. Inesperadament, trobem que no hi ha tanta diferència en l'expressió de l'mPGES-1 entre les mostres d'AAA i de NA. Aquests resultats es podrien justificar perquè la COX-2 i l'mPGES-1 no estan induïdes de la mateixa manera o bé perquè la regulació d'aquests dos enzims és diferent [37,39]. Un altre factor que podria contribuir al modest increment de l'mPGES-1 en les mostres d'AAA és la reducció de les VSMC que es produeix al llarg del desenvolupament de l'AAA. Les VSMC expressen l'mPGES-1 abundantment [39,84], i hem trobat immunoreactivitat per l'mPGES-1 en totes les cèl·lules vasculars de les mostres control incloses les VSMC.

Els resultats que obtenim després de l'estratificació dels pacients en funció del diàmetre de l'aorta mostren que el mecanisme biosintètic de la PGE<sub>2</sub> ja està estimulat en els grups de pacients LD, com els nivells del marcador de EC.

Com que la COX-2 i l'mPGES-1 s'expressen tant en les cèl·lules vasculares com en leucòcits infiltrants, hem determinat la producció d'altres icosanoides en mostres d'AAA. L'excel·lent correlació que hi ha entre la secreció de PGE<sub>2</sub> i la PGI<sub>2</sub>, la pobre correlació entre la PGE<sub>2</sub> i el TXA<sub>2</sub> i la l'absència de correlació entre la PGE<sub>2</sub> i el LTB<sub>4</sub> demostren que la biosíntesi de PGE<sub>2</sub> està associada principalment a les cèl·lules que produeixen PGI<sub>2</sub>. TXAS s'expressa bàsicament en macròfags i plaquetes, mentre que la 5-LO s'expressa exclusivament en leucòcits. La PGIS s'expressa en cèl·lules vasculares i no en leucòcits. Tenint en compte que la proporció de VSMC es redueix substancialment en el procés aneurismàtic, aquests resultats suggereixen que les MVEC són les més rellevants en la biosíntesi de PGI<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub>. Per una altra banda, l'expressió de la 15-PGDH, que inactiva (degrada) la PGE<sub>2</sub>, està augmentada en les mostres d'AAA. Aquest enzim no s'expressa en cèl·lules vasculares en cultiu i la seva expressió mostra una gran correlació amb els nivells d'mRNA del marcador de leucòcits CD45 tant en mostres control com d'AAA. Aquests resultats indiquen que la 15-PGDH està fonamentalment associada a la presència de leucòcits i suggereixen que la PGE<sub>2</sub> s'inactiva més ràpidament en leucòcits que no pas en cèl·lules vasculares, la qual cosa dóna suport al concepte de l'efecte autocrí de la PGE<sub>2</sub> sobre les MVEC.

Els receptors EPs són crucials a l'hora de determinar l'efecte de la PGE<sub>2</sub>. El paper de l'EP3 en l'angiogènesi no està del tot clar [128,129,146,147]. Hem trobat els nivells d'mRNA substancialment reduïts en les mostres d'AAA. Estudis d'immunohistoquímica mostren que el receptor EP3 es troba bàsicament en VSMC, tant en mostres control com d'AAA, i en leucòcits. L'EP3 també s'expressa en VSMC en cultiu. Tot plegat ens indica una disminució de



l'EP3 en les mostres d'AAA com a conseqüència de la disminució de la proporció de les VSMC. L'EP2 i l'EP4 estan relacionats en l'alliberació de factors proangiogènics i/o amb la mateixa angiogènesi [130,131,146,148]. L'expressió de l'EP2 i l'EP4 està augmentada en mostres d'AAA. L'EP2 es localitza en la capa mitjana, i predominantment en àrees d'infiltració leucocitària en les mostres d'AAA, mentre que l'EP4 s'expressa en la microvasculatura i en alguns leucòcits infiltrants. A més, l'EP4 és el receptor més abundant en MVEC en cultiu. La PGE<sub>2</sub> induïx angiogènesi *in vitro* via activació de l'EP4 en cèl·lules incubades amb IL-1 $\beta$ . Segons els nostres resultats sembla que l'efecte proangiogènic de l'activació de l'EP4 no depèn de factors de creixement, tot i que els hem trobat augmentats en mostres d'AAA.

Quan l'activitat de la COX és augmentada per la inducció de la COX-2 en absència de l'mPGES-1, com és el cas de les EC de la macrovasculatura, es produeix un excés de PGH<sub>2</sub> que és fàcilment transferida (mecanisme transcel·lular) a les cèl·lules veïnes perquè sintetitzin altres prostanoides específics [36,40,86]. Per tant la presència de l'mPGES-1 en algun tipus cel·lular és necessari per la biosíntesi de la PGE<sub>2</sub> [37-39,85]. Els resultats dels estudis d'immunohistoquímica demostren que l'mPGES-1 i l'EP4 s'expressen en MVEC. S'assumeix que generalment l'efecte angiogènic de la PGE<sub>2</sub> en malalties inflamatòries prové de la PGE<sub>2</sub> alliberada pels leucòcits infiltrants, principalment de macròfags i de cèl·lules tumorals. La coexpressió de la COX-2, de l'mPGES-1 i de l'EP4 en MVEC suporten la hipòtesi d'un paper rellevant de la PGE<sub>2</sub> alliberada per la MVEC en la hipervascularització produïda al llarg del desenvolupament de l'AAA. En les mostres d'AAA, la 15-PGDH, associada a la presència de leucòcits, està augmentada i dóna a entendre que la PGE<sub>2</sub>

alliberada per les MVEC té un efecte autocrí i que la PGE<sub>2</sub> en els leucòcits és ràpidament metabolitzada i es redueix notòriament el seu efecte. En el desenvolupament de l'AAA es produeix angiogènesi. La hipervascularització per sí mateixa podria atenuar la resistència mecànica del mur vascular i tenint en compte que aquesta afavoreix la infiltració leucocitària que activa la degradació de la MEC de la capa mitjana, podem concloure que és un procés que ajuda al desenvolupament de l'AAA.



## 6. CONCLUSIONS

1. Tots els enzims involucrats en la biosíntesi de PGE<sub>2</sub> incloent-hi l'mPGES-1 estan incrementats en l'AAA humà.
2. La 15-PGDH es troba localitzada principalment en els leucòcits.
3. Els receptors EP2 i EP4 estan incrementats en l'AAA mentre que l'EP3 està disminuït com a conseqüència de la pèrdua de VSMC.
4. El receptor EP4 és el més rellevant en l'endoteli vascular.
5. La COX-2, l'mPGES-1 i l'EP4 es coexpressen en l'endoteli dels *vasa vasorum* (MVEC).
6. L'activitat proangiogènica de la PGE<sub>2</sub> està mediada pel receptor EP4.
7. En l'AAA humà es produeix un procés angiogènic que facilita un posterior procés inflamatori.
8. Aquests resultats suggereixen l'mPGES-1 i el receptor EP4 com a dianes terapèutiques i alternatives a la COX-2.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Hollier LH, Stanson AW, Gloviczki P, et al. Arteriomegaly: classification and morbid implications of diffuse aneurysmal disease. *Surgery* 1983;93:700-8.
2. Conrad MF, Crawford RS, Davison JK, et al. Thoracoabdominal aneurysm repair: a 20-year perspective. *The Annals of thoracic surgery* 2007;83:S856-61.
3. Panneton JM, Hollier LH. Nondissecting thoracoabdominal aortic aneurysm. *Annals of vascular surgery* 1995;9:503-14.
4. Downs AR, Lye CR. Inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Canadian journal of surgery* 1986;29:50-3.
5. von Fritschen U, Malzfeld E, Clasen A, et al. Inflammatory abdominal aortic aneurysm: A postoperative course of retroperitoneal fibrosis. *J Vasc Surg* 1999;30:1090-8.
6. Leseche G, Schaetz A, Arrive L, et al. Diagnosis and management of 17 consecutive patients with inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Am J Surg* 1992;164:39-44.
7. Weintraub NL. Understanding abdominal aortic aneurysm. *N Engl J Med* 2009;361:1114-6.
8. Nordon IM, Hinchliffe RF, Loftus IM, et al. Pathology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nature Reviews Cardiology* 2011;8:92-102.
9. Wahlgren CM, Larson E, Magnusson PKE, et al. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in twin population. *J Vasc Surg* 2010;51:3-8.
10. Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg* 2003;38:329-34.
11. Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, et al. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm 2004;36:524-33.

12. Choke E, Thompson MM, Dawson J, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2077-82.
13. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, et al. Human Abdominal Aortic Aneurysm. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Path* 1990;137:1199-211.
14. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:987-94.
15. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577-89.
16. Thompson RW. Reflections on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Surg* 2002;10:389-94.
17. Choke E, Cockerill G, Wilson WR, et al. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005;30:227-44.
18. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2146-54.
19. Dietz HC, Mecham RP. Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. *Matrix biology* 2000;19:481-8.
20. Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad of Sci*. 1996;800:157-74.
21. Liapis CD, Paraskevas KI. The pivotal role of matrix metalloproteinases in the development of human abdominal aortic aneurysms. *Vasc Med* 2003;8:267-71.
22. Golledge J, Muller J, Daugherty A, et al. Abdominal aortic aneurysm. Pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2605-13.
23. Wills A, Thompson MM, Crowther M, et al. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms-Cellular and biochemical mechanisms. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;12:391-400.

24. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2005;112:232-40.
25. Tilson MD. The polymorphonuclear leukocyte and the abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 2005;112:154-6.
26. Houard X, Ollivier V, Louedec L, et al. Differential inflammatory activity across human abdominal aortic aneurysms reveals neutrophil-derived leukotriene B4 as a major chemotactic factor released from the intraluminal thrombus. *FASEB J* 2009;23:1376-83.
27. Reeps C, Pelisek J, Seidl S, et al. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology* 2009;76:243-52.
28. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, et al. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1085:315-9.
29. Tilson MD, Ozsvath KJ, Hirose H, et al. A genetic basis for autoimmune manifestations in the abdominal aortic aneurysm resides in the MHC class II locus DR-beta-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;800:208-15.
30. Smith, WL, DeWitt D L, Garavito R M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:145-82.
31. Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA. An integrated omics analysis of eicosanoids biology. *J of Lipid Res* 2009;50:1505-15.
32. Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev* 2004;24:399-424.
33. Bishop-Bailey D, Mitchell JA, Warner TD. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006;26:956-8.
34. Kulmacz RJ. Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides. *Biochem Biophys Res commun* 2005;338:25-33.
35. Godessart N, Vila L, Puig L, et al. Interleukin-1 increases 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid production in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1994;102:98-104.



36. Camacho M, López-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ Res* 1998;83:353-65.
37. Solà-Vilà D, Camacho M, Solà R, et al. IL-1 $\beta$  induces VEGF, independently of PGE<sub>2</sub> induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells. *Kidney Int* 2006;70:1935-41.
38. Soler M, Camacho M, Solà R, et al. Mesangial cells release untransformed prostaglandin H<sub>2</sub> as a major prostanoid. *Kidney Int* 2001;59:1283-9.
39. Camacho M, Gerbolés E, Escudero J-R, et al. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemostas* 2007;5:1411-9.
40. Camacho M, Vila L. Transcellular formation of thromboxane A<sub>2</sub> in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb Res* 2000;99:155-64.
41. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995;83:473-82.
42. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993;11:371-86.
43. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, et al. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994;94:2504-10.
44. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2317-21.
45. Lim H, Paria BC, Das SK, et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91:197-208.
46. Peskar BM, Maricic N. Role of prostaglandins in gastroprotection. *Dig Dis Sci* 1998;43:23S-9S.

47. Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, et al. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Gut* 2001;49:443-53.
48. Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost* 2006;96:401-6.
49. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl Acad* 1975;72:2994-8.
50. Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem* 1989;264:141-50.
51. Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A<sub>2</sub> receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins G<sub>q</sub> and G<sub>11</sub> in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F<sub>2</sub> alpha 1997. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281: 957-64.
52. Whittaker N, Bunting S, Salmon J, et al. The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). *Prostaglandins* 1976;12:915-28.
53. Wu KK, Liou JY. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:45-52.
54. Chiang CW, Yeh HC, Wang LH, et al. Crystal structure of the human prostacyclin synthase. *J Mol Biol* 2006;364:266-74.
55. Katsuyama M, Sugimoto Y, Namba T, et al. Cloning and expression of a cDNA for the human prostacyclin receptor. *FEBS Lett* 1994;344:74-88.
56. Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, et al. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* 1994;269:12173-8.
57. Aubert J, Ailhaud G, Negrel R. Evidence for a novel regulatory pathway activated by (carba)prostacyclin in preadipose and adipose cells. *FEBS Lett* 1996;397:117-21.
58. Kojo H, Fukagawa M, Tajima K, et al. Evaluation of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype selectivity of a variety of anti-inflammatory drugs based on a novel assay for PPAR delta(beta). *J Pharmacol Sci* 2003;93: 347-55.

59. Wade ML, Voelkel NF, Fitzpatrick FA. "Suicide" inactivation of prostaglandin I<sub>2</sub> synthase: Characterization of mechanism-based inactivation with isolated enzyme and endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 1995;321:453-8.
60. Zou MH, Ullrich V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS Lett* 1996;382:101-4.
61. Ito S, Narumiya S, Hayaishi O. Prostaglandin D<sub>2</sub>: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukot Essent FattyAcids* 1989;37: 219-34.
62. Abdel-Halim MS, Hamberg M, Sjoquist B, et al. Identification of prostaglandin D<sub>2</sub> as a major prostaglandin in homogenates of rat brain. *Prostaglandins* 1977;14:633-43.
63. Roberts LJ 2nd, Lewis RA, Oates JA, et al. Prostaglandin thromboxane, and 12-hydroxy-5,8,10,14- eicosatetraenoic acid production by ionophore-stimulated rat serosal mast cells. *Biochim Biophys Acta* 1979;575:185-92.
64. Urade Y, Tanaka T, Eguchi N, et al. Structural and functional significance of cysteine residues of glutathione-independent prostaglandin D synthase. Identification of Cys65 as an essential thiol. *J Biol Chem* 1995;270:1422-8.
65. Shimamoto S, Yoshida T, Inui T, et al. NMR solution structure of lipocalin-type prostaglandin D synthase: evidence for partial overlapping of catalytic pocket and retinoic acid-binding pocket within the central cavity. *J Biol Chem* 2007;282:31373-9.
66. Kanaoka Y, Ago H, Inagaki E, et al. Cloning and crystal structure of hematopoietic prostaglandin D synthase. *Cell* 1997;90:1085-95.
67. Pettipher R. The roles of the prostaglandin D(2) receptors DP(1) and CRTH2 in promoting allergic responses. *Br J Pharmacol* 2008.153:191-9.
68. Sawyer N, Cauchon E, Chateauneuf A, et al. Molecular pharmacology of the human prostaglandin D<sub>2</sub> receptor, CRTH2. *Br J Pharmacol* 2002;137:1163-72.

69. Samuelsson B, et al. Isolation and identification of prostaglandins from human seminal plasma. 18. Prostaglandins and related factors. *J Biol Chem* 1963;238:3229-34.
70. Basu, S. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F<sub>2</sub>α from physiology to new principles in inflammation. *Med Res Rev* 2007;27:435-68.
71. Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, et al. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* 1994;269:2632-6.
72. Daiyasu H, Watanabe K, Toh T. Recruitment of thioredoxin-like domains into prostaglandin synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:281-6.
73. Suzuki-Yamamoto T, Nishizawa M, Fukui M, et al. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* 1999;462:335-40.
74. Komoto J, Yamada T, Watanabe K, et al. Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry* 2004;43:2188-98.
75. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56:387-437.
76. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and secretion: the role of PGE<sub>2</sub> synthases. *Clin Immunol* 2006;119: 229-40.
77. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-226.
78. Yamada T, Komoto J, Watanabe K, et al. Crystal structure and possible catalytic mechanism of microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES-2). *J Mol Biol* 2005;348:1163-76.
79. Tanioka T, Nakatani Y, Kobayashi T, et al. Regulation of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase by 90-kDa heat shock protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303:1018-23.
80. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, et al. Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:383-99.

81. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, et al. Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 2000;275:32775-82.
82. Vazquez-Tello A, Fan L, Hou X, et al. Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E2 synthases and cyclooxygenases in the brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:1155-63.
83. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7220-5.
84. Samuelsson B, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Membrane prostaglandinE synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 2007;59:207-24.
85. Soler M, Camacho M, Escudero JR, et al. Human Vascular Smooth Muscle Cells but not Endothelial Cells Express Prostaglandin E Synthase. *Circ Res* 2000;87:504-7.
86. Salvado MD, Alfranca A, Escolano A, et al. COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH<sub>2</sub> for transcellular metabolism to PGE<sub>2</sub> by tumor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1131-7.
87. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, et al. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:884-9.
88. Hayashi H, Fujii Y, Watanabe K, et al. Enzymatic formation of prostaglandin F 2 alpha in human brain. *Neurochem Res* 1990;15:385-92.
89. Tai HH, Ensor CM, Tong M, et al. Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:483-93.
90. Cho H, Huang L, Hamza A, et al. Role of glutamine 148 of human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in catalytic oxidation of prostaglandin E2. *Bioorg Med Chem* 2006;14:6486-91.

91. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colontumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12098-102.
92. Chou WL, Chuang LM, Chou CC, et al. Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem* 2007;282:18162-72.
93. Murphy RC, Hammarstrom S, Samuelsson B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytomacells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4275-9.
94. Morinelli TA, Zhang L-M, Newman WH, et al. Thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub>-stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated protein kinase and S6 kinase. *J Biol Chem* 1994;269:5693-8.
95. Le Breton GC, Venton DL, Enke SE, et al. 13-Azaprostanoic acid: a specific antagonist of the human blood platelet thromboxane/endoperoxide receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4097-101.
96. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Effect of serotonin, thromboxane A<sub>2</sub>, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 1997;96:2280-6.
97. Ishizuka T, Kawakami M, Hidaka T, et al. Stimulation with thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) receptor agonist enhances ICAM<sub>1</sub>, VCAM<sub>1</sub> or ELAM<sub>1</sub> expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1998;112:464-70.
98. Ishizuka T, Sawada S, Sugama K, et al. Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) receptor blockade suppresses monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by stimulated vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 2000;120:71-8.
99. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, et al. Thromboxane A<sub>2</sub> is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999;59:4574-7.
100. Cheuk BLY, Cheng SWK. Can local secretion of prostaglandin E<sub>2</sub>, thromboxane B<sub>2</sub>, and interleukin-6 play a role in ruptured abdominal aortic aneurysm? *World J Surg* 2008;32:55-61.

101. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 1997;388:678-82.
102. Schleimer RP. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Immunol Today 1987;9:327.
103. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, et al. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J Biol Chem* 1992;267:515-9.
104. Varga J, Diaz-Pérez A, Rosenbloom J, et al. PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and II procollagen mRNAs in normal dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;147:1282-8.
105. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al. The COX-2/PGE<sub>2</sub> pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009;30:377-386.
106. Holmes DR, Wester W, Thompson RW, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997;25:810-5.
107. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, et al. Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in abdominal aortic aneurysms. Implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999;100:48-54.
108. Bayston T, Ramessur S, Reise J, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 2003;38:354-9.
109. King VL, Trivedi DB, Gitlin JM, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1137-43.
110. Gitlin JM, Trivedi DB, Langenbach R, et al. Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovasc Res* 2006;73:227-36.

111. Casós K, Siguero L, Fernández-Figueras MT, et al. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc Res* 2011;81:261-8.
112. Thorén S, Weinander R, Saha S, et al. Human microsomal prostaglandin E synthase-1. Purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* 2003;278:22199-209.
113. Forsberg L, Leeb L, Thoren S, et al. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett* 2000;471:78-82.
114. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis Res Ther* 2005;7:114-7.
115. Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, et al. Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 2002;29:1836-42.
116. Ekstrom L, Lyrenas L, Jakobsson PJ, et al. Basal expression of the human MAPEG members microsomal glutathione transferase 1 and prostaglandin E synthase genes is mediated by Sp1 and Sp3. *Biochem Biophys Acta* 2003;1627:79-84.
117. Uracz W, Uracz D, Olszanecki R, et al. Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2002;53:643-54.
118. Ouellet M, Falguyret JP, Ear PH, et al. Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin E synthase-1. *Protein Expr Purif* 2002;26:489-95.
119. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, et al. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 in IL-1beta-stimulated rat chondrocytes: evidence for PPARgamma-independent inhibition by 15-deoxy-Delta12,14 prostaglandin J<sub>2</sub>. *Arthritis Res Ther* 2005;7:1325-37.



120. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, et al. Membrane associated prostaglandin E synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2004;6:355-65.
121. Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundam Clin Pharmacol* 2005;19:255-61.
122. Vila L, Martínez-Pérez A, Camacho M, et al. Heritability of thromboxane A<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthetic machinery in a spanish population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:128-34.
123. McAdam BF, Castella-Lawson F, Mardini AI, Kapoor, et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:272-7.
124. Krötz F. Preserving vascular prostacyclin levels by microsomal E<sub>2</sub> synthase isoform-1 inhibition: a new strategy for vasoprotection? *J Throm Haemost* 2007;5:1409-10.
125. Wang M, Lee E, Song W, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2008;117:1302-9.
126. Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, et al. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J Physiol Pharmacol* 2013;64:409-21.
127. Taverne YJ, Bogers AJ, Duncker DJ, et al. Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:862423.
128. Cattaneo MG, Pola S, Dehò V. Alprostadil suppresses angiogenesis in vitro and in vivo in the murine Matrigel plug assay. *Br J Pharmacol* 2003;138:377-85.
129. Katoh H, Hosono K, Ito Y, et al. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am J Pathol* 2010;176:1469-83.
130. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, et al. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62:506-11.

131. Rao R, Redha R, Macias-Perez I, et al. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK Activation and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem* 2007; 282:16959-68.
132. Zhu Z, Fu C, Li X, et al. Prostaglandin E2 promotes endothelial differentiation from bone marrow-derived cells through AMPK. *PLoS One* 2011;6:e235-54.
133. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, et al. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228-32.
134. Petersen E, Wagberg F, Angquist KA. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:153-7.
135. Freestone T, Turner RJ, Coady A, et al. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thrombo Vasc Biol* 1995;15:1145-51.
136. Herron, GS, Unemori E, Wong M, et al. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:1667-77.
137. Sheng H, Shao J, Washington MK, et al. Prostaglandin E2 increases growth and motility colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:18075-81.
138. Kuwao T, Nakao S, Yamamoto H. Cyclooxygenase 2 is a key for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J* 2004;18:300-10.
139. Gille H, Kowalski J, Li B, et al. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR1) and KDR (VEGFR2). *J Biol Chem* 2001;276:3222-30.
140. Yanni SE, Barnett JM, Clark ML. The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5479-86.
141. Zhang Y, Daaka Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA C  $\gamma$  pathway. *Ame Soc Hemat* 2013;118:5355-64.
142. Ensor CM, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:313-9.

143. Chapple KS, Parry DJ, McKenzie S, et al. Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2007;21:61-6.
144. Cheuk BL, Cheng SW. Differential secretion of prostaglandin (E(2), thromboxane A(2) and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysm. *Int J Mol Med* 2007;20:391-5.
145. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett* 1995;372:83-7.
146. Sennlaub F, Valamanesh F, Vazquez-Tello A, et al. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation* 2003;108:198-204.
147. Shoji Y, Takahashi M, Kitamura T, et al. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut* 2004;53:1151-8.
148. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2002;62:28-32.

## **8. PUBLICACIONS**



## Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm

Mercedes Camacho,<sup>1,\*</sup> Jaume Dilmé,<sup>\*,†</sup> David Solà-Vilà,<sup>§</sup> Cristina Rodríguez,<sup>\*\*,†</sup>  
Sergi Bellmunt,<sup>\*,†</sup> Laura Siguero,<sup>\*</sup> Sonia Alcolea,<sup>\*</sup> José-María Romero,<sup>\*,†</sup>  
José-Román Escudero,<sup>\*,†</sup> José Martínez-González,<sup>\*\*,†</sup> and Luis Vila<sup>\*</sup>

Angiology, Vascular Biology, and Inflammation Laboratory,<sup>\*</sup> Vascular Surgery Department,<sup>†</sup> and Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC),<sup>\*\*</sup> Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain; and Autonomous University of Barcelona,<sup>§</sup> Barcelona, Spain

**Abstract** We investigated the prostaglandin (PG)<sub>E2</sub> pathway in human abdominal aortic aneurysm (AAA) and its relationship with hypervascularization. We analyzed samples from patients undergoing AAA repair in comparison with those from healthy multiorgan donors. Patients were stratified according to maximum aortic diameter: low diameter (LD) (<55 mm), moderate diameter (MD) (55–69.9 mm), and high diameter (HD) (≥70 mm). AAA was characterized by abundant microvessels in the media and adventitia with perivascular infiltration of CD45-positive cells. Like endothelial cell markers, cyclooxygenase (COX)-2 and the microsomal isoform of prostaglandin E synthase (mPGES-1) transcripts were increased in AAA (4.4- and 1.4-fold, respectively). Both enzymes were localized in vascular cells and leukocytes, with maximal expression in the LD group, whereas leukocyte markers display a maximum in the MD group, suggesting that the upregulation of COX-2/mPGES-1 precedes maximal leukocyte infiltration. Plasma and in vitro tissue secreted levels of PGE<sub>2</sub> metabolites were higher in AAA than in controls (plasma-controls, 19.9 ± 2.2; plasma-AAA, 38.8 ± 5.5 pg/ml; secretion-normal aorta, 16.5 ± 6.4; secretion-AAA, 72.9 ± 6.4 pg/mg; mean ± SEM). E-prostanoid receptor (EP)-2 and EP-4 were overexpressed in AAA, EP-4 being the only EP substantially expressed and colocalized with mPGES-1 in the microvasculature. Additionally, EP-4 mediated PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis in vitro. We provide new data concerning mPGES-1 expression in human AAA. **Our findings suggest the potential relevance of the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in the AAA-associated hypervascularization.**—Camacho, M., J. Dilmé, D. Solà-Vilà, C. Rodríguez, S. Bellmunt, L. Siguero, S. Alcolea, J.-M. Romero, J.-R. Escudero, J. Martínez-González, and L. Vila. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 3506–3515.

**Supplementary key words** cyclooxygenase pathway • prostaglandin • angiogenesis • cyclooxygenase • E prostanoid receptor • microsomal isoform of prostaglandin E synthase

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a late-age onset disorder that affects a high percentage of the population in industrialized countries, and rupture of AAA is associated with high mortality rates (1). The etiology of AAA is complex with a relevant contribution of genetic factors (2). Although much effort has been made to clarify the mechanism of AAA development, currently the only effective approach to prevent aneurysm rupture is surgical repair by conventional or endovascular techniques.

Evidence has been established for a relationship between atherosclerosis and AAA, both disorders being characterized by an underlying chronic inflammation. However, there are marked differences between atherosclerotic lesions and AAA. Whereas atherosclerotic plaque is characterized by leukocyte infiltration at the lumen site and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) causing neointimal hyperplasia, AAA is characterized by leukocyte infiltration into adventitia and depletion of VSMCs in the media. Other relevant features of AAA are the wall tension strength breakdown caused by proteolytic enzymes progressively destructing elastic fibers (3) and hypervascularization of aortic tissue. It has been proposed that this vascularization might contribute to the development and rupture of aneurysms (4, 5).

Abbreviations: AAA, abdominal aortic aneurysm; AAc, arachidonic acid; COX, cyclooxygenase; EC, endothelial cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EP, E-prostanoid receptor; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein; HD, high diameter; LD, low diameter; LT, leukotriene; MD, moderate diameter; MMP, metalloproteinase; mPGES-1, microsomal isoform of prostaglandin E synthase; MVEC, microvascular endothelial cell; NA, normal aorta; PG, prostaglandin; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; VSMC, vascular smooth muscle cell; vWF, von Willebrand factor.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.  
e-mail: mcamacho@santpau.cat

This study was supported partially by grants SAF2010/21392, FIS PI12/01952 and Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051 and RD12/0042/0053 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). The authors have no conflicts of interest to declare.

Manuscript received 18 July 2013 and in revised form 14 October 2013.

Published, JLR Papers in Press, October 15, 2013

DOI 10.1194/jlr.M042481

Prostaglandin (PG) $E_2$  has been recognized as a relevant mediator in AAA. Biosynthesis of PGE $_2$  begins with the formation of PGH $_2$  through the action of cyclooxygenase (COX) (6, 7) on arachidonic acid (AAc) released by phospholipases from the membrane phosphoglycerides. PGH $_2$  is then isomerized to PGE $_2$  by PGE synthases. The microsomal isoform of prostaglandin E synthase (mPGES-1) is inducible by proinflammatory cytokines and seems to be the main isoenzyme involved in PGE $_2$  biosynthesis under inflammatory conditions (8–11). COX-2/mPGES-1 is widely regarded as the major contributing enzymatic chain for PGE $_2$  biosynthesis under pathological conditions. COX-2-derived PGE $_2$  is involved in the pathogenesis of AAA, as data from animal models and human studies indicate (12–15). Furthermore, deletion of mPGES-1 attenuates experimental AAA in mice (16).

PGE $_2$  exerts its cellular effects by binding to four distinct E-prostanoid receptors (EP-1–4) that belong to the family of seven transmembrane G protein-coupled receptors. Each receptor is involved in different and often opposite biological effects of PGE $_2$ . EP-2 and EP-4 are both Gs-protein coupled receptors that upregulate intracellular cAMP levels, whereas EP-3 usually counteracts EP-2- and EP-4-mediated upregulation of cAMP by preferentially coupling to Gi proteins (17). Recently, conflicting results have been reported on the role of EP-4 in AAA development in animal models (18–20). These studies have been focused on the involvement of EPs in the activation of leukocytes (mainly macrophages) and VSMCs, and in the release of proteases during the immune-inflammatory process associated to AAA.

Main data regarding COX-2-alternative targets for the development of new anti-inflammatory drugs for AAA comes from studies in animal models (16, 18–20). In these models, AAA develops fast and its etiology differs substantially from human pathology. Despite the role of PGE $_2$  in neovascularization in cancer and other pathologies, and that the relevance of angiogenesis in AAA is widely accepted, information concerning COX-2/mPGES-1-derived PGE $_2$  in the AAA, particularly in AAA-associated hypervascularization, is limited and restricted to COX-2-derived PGE $_2$  from macrophages (12, 13, 21, 22). Furthermore, the beneficial effects of COX-2 inhibitors and the deletion of mPGES-1 or EP-4 in experimental AAA are not fully understood in the context of this pathology in humans. Because PGE $_2$  modifiers have a possible therapeutic potential, the objective of the present study was to examine the elements involved in the PGE $_2$  pathway in human AAA, particularly in microvasculature.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue samples

The study was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Ethics Committee, and informed consent was obtained from each patient. All procedures were reviewed by the Institutional Review Board at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. The aortic biopsies were obtained from patients undergoing open repair for AAA at our institution. Samples were obtained from the remaining mid-infrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic

replacement of AAA. Normal aortas (NAs) were obtained from healthy aortas of multiorgan donors and samples were also taken from the mid-portion of the infrarenal abdominal aorta at the time of organ harvest. When a luminal thrombus was present in AAA samples, it was separated before the aortic biopsy was taken and aortic tissue was washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS). A portion of each sample was placed in RNAlater solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C for 24 h before long-term storage at –80°C until further processing for RNA isolation. Another portion was fixed in formalin solution 10% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) for 24 h and included in paraffin for immunohistochemical studies. Additional portions of aorta were placed in PBS to establish VSMC cultures and to obtain tissue secretomes.

Patients were stratified by the maximum transverse aortic diameter defining three groups: low diameter (LD) (<55 mm); moderate diameter (MD) (55–69.9 mm); and high diameter (HD) ( $\geq$ 70 mm). To determine the maximum aortic diameter, we used a transversal measurement to the true lumen center line at infrarenal level, based on computerized tomography angiography with endovenous contrast, using Workstation AGFA IMPAX 6.4.0.4010 and OsiriX MD (US Food and Drug Administration cleared/CE IIA version) for primary diagnostic. Because surgical repair is not usually indicated in patients with an AAA maximal diameter of <55 mm, the aortic samples of the LD group were from patients with concomitant iliac artery aneurysm to be surgically repaired. **Table 1** shows the characteristics of the individuals included in the study.

### Analysis of mRNA levels in the tissues and culture cells

For total RNA extraction, tissue samples stored in RNAlater were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH) and RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from cell cultures using Ultraspec (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcribing 1  $\mu$ g RNA with the high-capacity cDNA archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA expression of the selected genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT system using predesigned validated assays (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/ $\beta$ -actin ratios.

### Analysis of PGE $_2$

To analyze plasma levels, a sample of 10 ml of peripheral blood was collected from all participants in heparin-containing tubes. In the case of AAA patients, blood was collected before anesthesia in the operating room. It was centrifuged immediately and the plasma aliquoted and frozen at –80°C until analysis. It is known that PGE $_2$  is rapidly transformed *in vivo* into 13,14-dihydro-15-oxo-PGE $_2$  that is unstable, and it undergoes a further transformation into 13,14-dihydro-15-oxo-PGA $_2$  (23, 24). To evaluate plasma levels of PGE $_2$ , we used an enzyme immunoassay kit that converts 13,14-dihydro-15-oxo metabolites of PGE $_2$  into a single stable derivative (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) following manufacturer's instructions.

Secretomes were obtained from approximately 150 mg of NA and AAA aortic fragments by incubating the tissues in 1 ml serum-free DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) in a cell incubator for 48 h. Medium was then recovered and kept at –80°C until the PGE $_2$  metabolites, 6-oxo-PGF $_{1\alpha}$ , thromboxane (Tx) B $_2$ , and leukotriene (LT)B $_4$ , released were analyzed by enzyme immunoassay (Cayman Chemical) following manufacturer's instructions.

TABLE 1. Clinical characteristics of individuals with AAA and NA included in the study: demographics and risk factors

Characteristic	Measurements					
	mRNA levels		Plasma PGE <sub>2</sub> M		Secretion <sup>a</sup>	
	AAA	NA	AAA	Controls	AAA	NA
Number	86	25	39	39	32	15
Aortic diameter <sup>b</sup> (mm)	66.7 ± 13.5	—	63.3 ± 9.8	—	68.26 ± 13.1	—
LD (<55 mm)	49.7 ± 6.4	—	52.8 ± 1.2	—	—	—
MD (55–69.9 mm)	60.1 ± 3.2	—	59.9 ± 3.6	—	—	—
HD (≥70 mm)	80.8 ± 7.5	—	76.5 ± 6.7	—	—	—
Age (years)	70.9 ± 6.6	56.3 ± 16.0	71.2 ± 6.7	62.9 ± 3.0	71.2 ± 8.1	55.7 ± 16.1
Male	84 (97.7%)	16 (64%)	35 (89.7%)	34 (87.2%)	32 (100%)	7 (46.7%)
Diabetes mellitus	19 (22.1%)	2 (8%) <sup>e</sup>	10 (25.6%)	1 (2.6%)	6 (18.8%)	2 (13.3%)
Hypertension	55 (64%)	2 (8%) <sup>e</sup>	34 (87.2%)	14 (35.9%)	22 (68.8%)	2 (13.3%)
Hyperlipidemia	55 (64%)	2 (8%) <sup>e</sup>	30 (76.9%)	1 (2.6%)	21 (65.6%)	2 (13.3%)
Smoking habit						
Non-smokers	7 (8.1%)	21 (84%) <sup>e</sup>	3 (7.7%)	30 (76.9%)	2 (6.2%)	11 (73.3%)
Current smokers	26 (30.2%)	3 (12%) <sup>e</sup>	9 (23.1%)	6 (15.4%)	10 (31.2%)	3 (20%)
Ex-smokers <sup>c</sup>	53 (61.6%)	1 (4%) <sup>e</sup>	27 (69.2%)	3 (7.7%)	20 (62.5%)	1 (6.7%)
Coronary artery disease	22 (25.6%)	0 <sup>e</sup>	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)	0 <sup>e</sup>
Angor pectoris	3 (3.5%)	0 <sup>e</sup>	1 (2.6%)	0	3 (9.4%)	0 <sup>e</sup>
Myocardial infarction	6 (7%)	0 <sup>e</sup>	6 (15.4%)	0	1 (3.1%)	0 <sup>e</sup>
Coronary intervention/CABG	13 (15.1%)	0 <sup>e</sup>	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)	0 <sup>e</sup>
Chronic renal insufficiency <sup>d</sup>	36 (41.9%)	0 <sup>e</sup>	13 (33.3%)	0	10 (31.2%)	0 <sup>e</sup>
Dialysis	0 (0%)	0 <sup>e</sup>	0 (0%)	0	0	0 <sup>e</sup>
Peripheral vascular disease	44 (51.1%)	0 <sup>e</sup>	21 (53.8%)	0	17 (53.2%)	0 <sup>e</sup>
Absence pulses	29 (33.7%)	0 <sup>e</sup>	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)	0 <sup>e</sup>
Intermittent claudication	15 (17.4%)	0 <sup>e</sup>	7 (17.9%)	0	6 (18.8%)	0 <sup>e</sup>
Cerebrovascular disease	7 (8.1%)	1 (4%) <sup>e</sup>	4 (10.3%)	0	2 (6.2%)	2 (13.3%)
Cerebral vascular attack	5 (5.8%)	1 (4%) <sup>e</sup>	3 (7.7%)	0	2 (6.2%)	2 (13.3%)
Transient ischemic attack	2 (2.3%)	0 <sup>e</sup>	1 (2.6%)	0	0	0 <sup>e</sup>
COPD	27 (31.4%)	0 <sup>e</sup>	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)	0 <sup>e</sup>
Antiplatelet users	39 (45.9%)	1 (4%) <sup>e</sup>	19 (50%)	0	15 (48.4%)	1 (6.7%)
Statins users	53 (61.6%)	0 <sup>e</sup>	30 (76.9%)	7 (17.9%)	19 (59.4%)	0 <sup>e</sup>
ACE inhibitors users	20 (24.1%)	0 <sup>e</sup>	13 (33.3%)	6 (15.4%)	8 (25.8%)	0 <sup>e</sup>
NSAID users	6 (7%)	0 <sup>e</sup>	3 (7.7%)	0	3 (9.4%)	0 <sup>e</sup>
Corticoid users	6 (7%)	0 <sup>e</sup>	1 (2.6%)	0	2 (6.2%)	0 <sup>e</sup>
Immunosuppressors users	4 (4.7%)	0 <sup>e</sup>	0 (0%)	0	1 (3.1%)	0 <sup>e</sup>

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean ± SD. eGFR, estimated glomerular filtration rate; CABG, coronary artery bypass grafting; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; PGE<sub>2</sub>M, PGE<sub>2</sub> metabolites; ACE, angiotensin-converting enzyme; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug.

<sup>a</sup>PGE<sub>2</sub> secretion by NA and AAA samples.

<sup>b</sup>Aneurysm maximum transverse diameter in mm.

<sup>c</sup>Quit smoking for more than 1 year.

<sup>d</sup>Estimated glomerular filtration rate <60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.

<sup>e</sup>In some cases due to the nature of NA samples some of the clinical characteristics are not always recorded and infra-evaluation of them is probable.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed using a mouse monoclonal antibody anti-COX-2 (ref 160112 clone CX229, diluted 1:50), rabbit polyclonal antibodies against EP-2 (ref 101750, diluted 1:1,000), EP-3 (ref 101760, diluted 1:400), and EP-4 (ref 101775, diluted 1:100) all from Cayman Chemical; and a rabbit polyclonal antibody against mPGES-1 (ref HPA045064 Prestige antibodies, diluted 1:50) from Sigma. Blanks were performed using the corresponding blocking peptides all from Cayman. Monoclonal antibodies (ref M0616, diluted 1:35; ref IR751, without further dilution) from Dako were used for von Willebrand factor (vWF) [endothelial cell (EC) marker] and CD45 (leukocyte marker) immunostaining. Three micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex kit. Diaminobenzidine was used as chromogen. Immunostainings used for comparative purposes were processed simultaneously.

### Microvascular endothelial cell culture

Microvascular endothelial cells (MVECs) were isolated from human adult foreskins using a previously described technique

(25, 26). In brief, foreskins obtained from adult circumcisions were placed in PBS supplemented with penicillin (200 units/ml), streptomycin (200 µg/ml), and amphotericin B (0.5 µg/ml) (all from Biological Industries). Foreskins were cut into 3 mm squares and placed in PBS containing 0.3% trypsin and 1% EDTA at 37°C for 30 min. Segments were then washed several times with PBS, placed in a Petri dish in M199 containing 10% FBS, and individually compressed with the side of a scalpel blade to express microvascular fragments. The microvascular segments were passed through a 150 µm stainless steel mesh and collected by centrifugation at 300 g for 15 min. MVECs were seeded on a gelatin-coated cell culture flask and cultured in medium MCDB 131 with 20% FBS; L-glutamine (2 mmol/l), penicillin (200 units/ml), streptomycin (200 µg/ml), EGF (20 ng/ml), and bFGF (5 ng/ml) (all from Biological Industries). When cells reached confluence, they were purified with Dynabeads CD31 (Dynabeads; Invitrogen Dynal ASA, Oslo, Norway) following the manufacturer's instructions. Flow cytometry and positive staining for CD31 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 confirmed the purity of the cell population. MVECs in passage 3 were used for mRNA determinations and in passages 5–7 for angiogenesis assays.



### Aortic VSMC culture

Aortic human VSMC cultures were established by an explant procedure from multi-organic donor aortas as previously described (9, 10). The artery was longitudinally split and the endothelium was removed by gently scraping. The tissue was minced and seeded onto the culture surface in a small volume of DMEM medium containing 10% FBS (Biological Industries). VSMCs were characterized by  $\alpha$ -actin positive staining.

### Immunofluorescence staining of mPGES-1 and EP-4 in MVECs

MVECs (passage 3) grown in Millicell EZslide (Millipore Corporation, Billerica, MA) were fixed in methanol:acetone (1:1) at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 20 min. For double immunostaining, cells were incubated with a mouse monoclonal antibody, anti-mPGES-1 (ref 10004350, diluted 1:100), and a rabbit polyclonal antibody, anti-EP4 (ref 101775, diluted 1:100) (both from Cayman) simultaneously for 60 min. This was followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) incubation for 1 h. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma) in PBS for 10 min. The slips were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR) and photographed through an Olympus BX50 microscope.

### In vitro angiogenesis assay

In vitro angiogenesis assays were performed with MVECs as described (27, 28). Briefly,  $12.5 \times 10^3$  cells were seeded onto Matrigel (BD Matrigel basement membrane matrix; BD Biosciences, Bedford, MA) in 96-well plates and exposed to treatments as required. For IL-1 $\beta$  assays, cells were preincubated for 1 h with the assay medium with or without 50 U/ml of human recombinant IL-1 $\beta$  (Roche Diagnostics GmbH) before being seeded into Matrigel. After 4 h of treatment, photographs were taken with an Olympus digital camera mounted on an Olympus IMT-2 inverted microscope using a  $10\times/0.40$  objective, and the number of closed polygons in the EC mesh was counted.

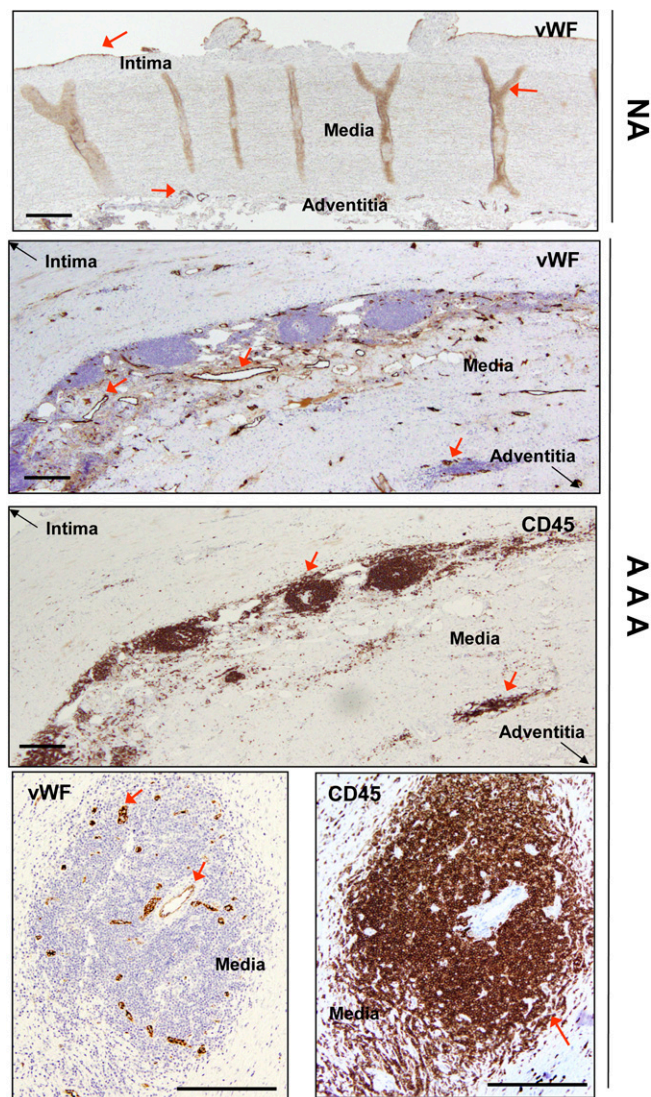
### Statistical analysis

Sigma-Stat software was used for statistical analysis. When data fit a normal distribution, statistical significance between more than two groups was assessed using one-way ANOVA and the Student-Newman-Keuls test; Student's *t*-test was used to compare two groups. When normality failed, we used the Mann-Whitney rank sum test to compare two groups and Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks for multiple comparisons (Dunn's method). To determine association between variables, data were Log10 transformed in order to normalize their distribution and the Pearson product moment correlation method was then used. A *P* value below 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### Evaluation of hypervascularization and leukocyte infiltration in AAA samples

Table 1 summarizes the characteristics of patients and donors included in this study. We used vWF immunostaining to assess the distribution of microvessels in aortic samples. Microvessels in NAs originated in the adventitia, distributed regularly, traversed media, and finished in the intima (many of them after bifurcation), but round microvessels in the media were scarce (Fig. 1). Microvessels were abundant in the adventitia and in the media of AAA



**Fig. 1.** Representative immunohistochemical images of vWF and CD45 in aortic samples. Top panel shows NA immunostained with anti-vWF. Middle panels show serial sections of an AAA sample immunostained for vWF and CD45. Bottom panels are serial sections of an AAA sample immunostained for vWF and CD45 showing leukocyte perivascular accumulation. Red arrows highlight specific immunostaining. In the middle panels, black arrows are used to orient the position of the vessel by indicating where the intima and adventitia are. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$ .

samples (Fig. 1), but were often absent in the intima. While infiltrated leukocytes (determined by CD45 immunostaining) were scarce in NAs, they were common in AAAs. Observation of 20 AAA samples revealed infiltrating leukocytes in the media in all of them. Adventitia was also extensively vascularized with a concomitant accumulation of leukocytes. Leukocyte infiltrate was systematically located in perivascular areas of microvessels (Fig. 1).

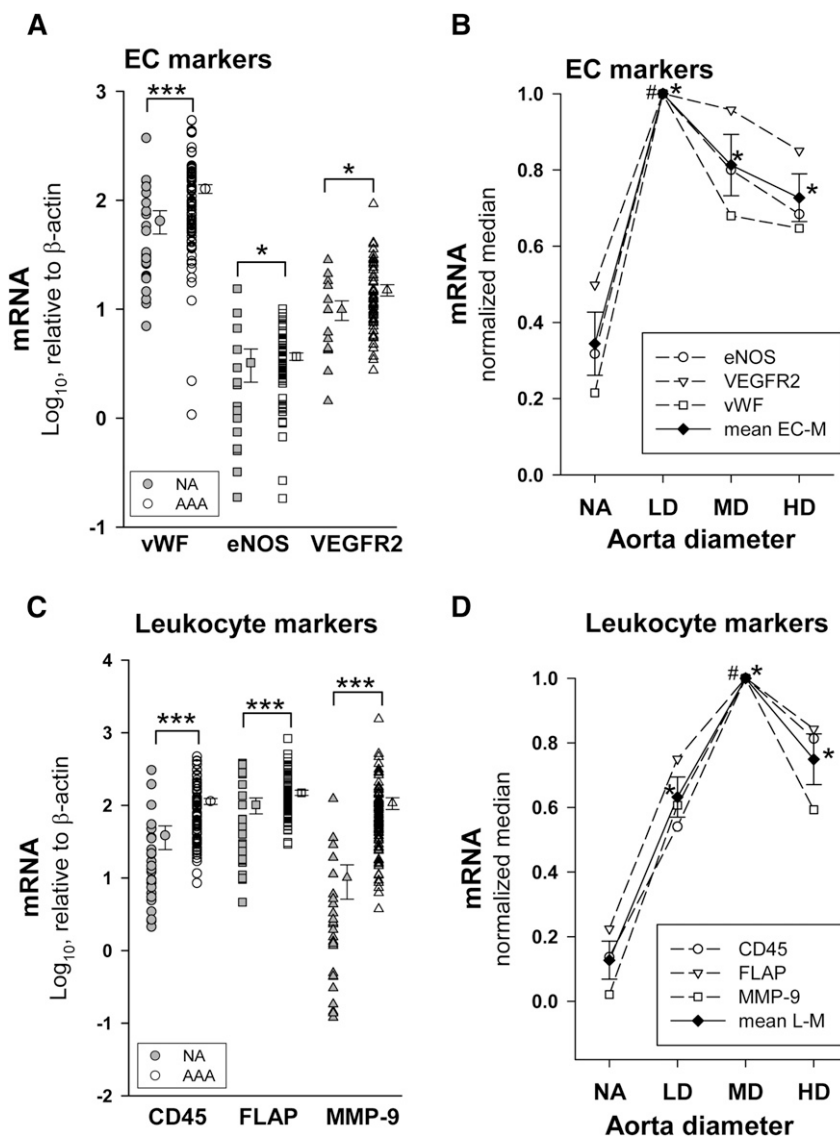
We determined mRNA levels of two EC markers, vWF and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), as an index of vascularization. In addition, we also analyzed expression levels of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2), a gene highly expressed in EC. Expression levels of these genes did not fit a normal distribution. Results in

**Fig. 2A** show that mRNA expression levels of the three genes were significantly enhanced in AAA. To further evaluate levels of these markers at different stages of AAA development, we stratified AAA samples as a function of the maximum aortic diameter. Figure 2B shows the median of the EC marker expression for each AAA diameter group. We observed that expression of all three markers was maximal in the LD group and decreased thereafter. We also analyzed the expression levels of two leukocyte markers (undetectable in vascular cells in culture, data not shown), CD45 and FLAP. Additionally, we

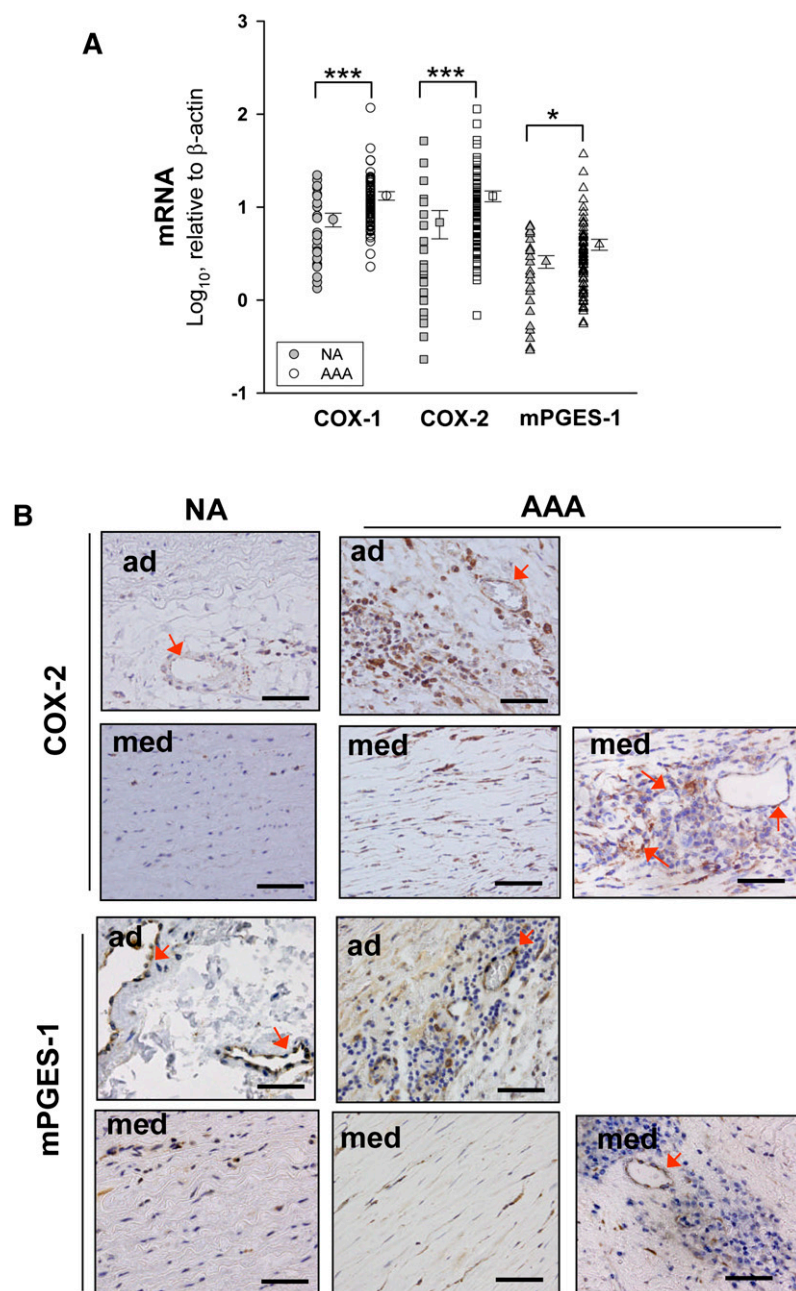
analyzed the expression of MMP-9, a metalloproteinase highly expressed by leukocytes. All of them were highly expressed in AAA samples (Fig. 2C) and exhibited a maximum in the MD group (Fig. 2D).

#### Expression of the enzymes involved in PGE<sub>2</sub> biosynthesis

Results in **Fig. 3A** show that the expression of COX isoenzymes and mPGES-1 was significantly higher in AAA than in NA samples. Immunohistochemistry showed that COX-2 expression was weak but ubiquitous in NA samples, mainly in adventitial microvessels and in medial VSMCs



**Fig. 2.** A: Expression levels of EC markers in NA (eNOS and VEGFR2,  $n = 17$ ; vWF,  $n = 25$ ) and AAA samples (vWF,  $n = 86$ ; eNOS and VEGFR2,  $n = 60$ ). Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  when compared with NA samples. B: Open points are the relative median values of mRNA levels of EC markers normalized to the highest median value in the stratified patient groups as a function the aortic diameter [NA,  $n = 25$ ; LD ( $<55$  mm),  $n = 14$ ; MD (55–69.9 mm),  $n = 37$ ; and HD ( $\geq 70$  mm),  $n = 35$ ], closed points are the mean  $\pm$  SEM of the three EC markers (mean EC-M). \* $P < 0.05$  compared with NA; # $P < 0.05$  when compared with the other patient groups. C: mRNA levels of leukocyte markers in NA ( $n = 25$ ) and AAA ( $n = 86$ ) samples; \*\*\* $P < 0.001$  when compared with NA samples. D: Open points are the relative median values of mRNA levels of leukocyte characteristic proteins normalized to the highest median value of the stratified patient groups; closed points are the mean  $\pm$  SEM of the three leukocyte markers (mean L-M). \* $P < 0.05$  compared with NA; # $P < 0.05$  when compared with the other patient groups.



**Fig. 3.** A: Expression levels of COX isoenzymes and mPGES-1 in NA (n = 25) and AAA (n = 86) samples. Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean  $\pm$  SEM. \* $P$  < 0.05, \*\*\*  $P$  < 0.001 when compared with NA samples. B: Representative examples of immunohistochemistry for COX-2 and mPGES-1 in NA and AAA samples. Arrows indicate some immunostained cells in microvessels. ad, adventitia; med, media. Scale bars: 100  $\mu$ m.

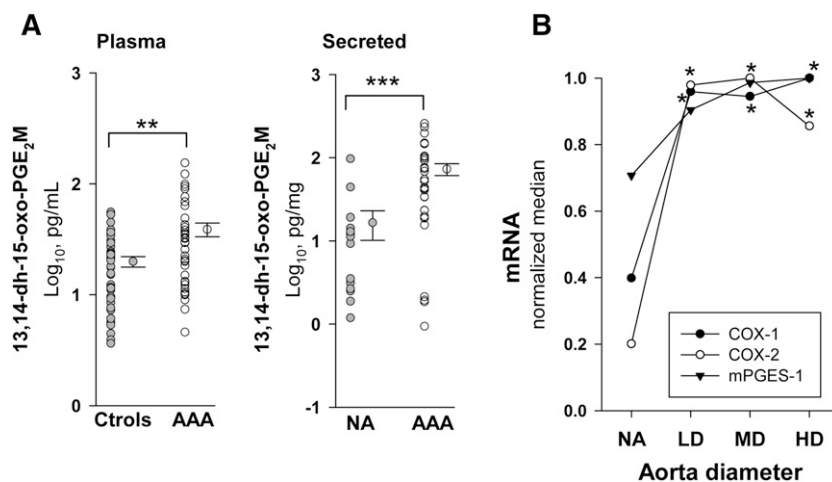
(Fig. 3B). In AAA samples, we found COX-2 immunostained MVECs in the adventitia and media layers, VSMCs in the media, and also infiltrating leukocytes, immunostaining being markedly increased in AAA (Fig. 3B). Localization of mPGES-1 was similar to that of COX-2, NA, and AAA, displaying apparent similar immunostaining intensity (Fig. 3B).

In an attempt to approach the relative contribution of the endothelium to PGE<sub>2</sub> production in AAA, we determined the statistical association of PGE<sub>2</sub> with other cell-characteristic eicosanoids secreted by AAA samples considered as independent variables. The best association was found between PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> (in terms of its stable metabolite 6-oxo-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ;  $R = 0.890$ ,  $P = 9.95 \times 10^{-12}$ ,  $n = 32$ ). The statistical association between PGE<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub> (in terms of TxB<sub>2</sub>) was weaker ( $R = 0.492$ ,

$P = 0.007$ ), and no association between PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub> was observed.

#### Expression levels of PGE<sub>2</sub> biosynthetic pathway enzymes in AAA stratified by aortic diameter

Because PGE<sub>2</sub> is rapidly transformed in vivo, we analyzed plasma levels of its 13,14-dihydro-15-oxo-metabolites. Circulating levels of PGE<sub>2</sub> metabolites were significantly elevated in AAA patients compared with normal controls (Fig. 4A). The characteristics of patients and controls included are shown in Table 1. In Fig. 4A, we also show production of PGE<sub>2</sub> by NA and AAA samples after 48 h of incubation. AAA samples produced about 5-fold more PGE<sub>2</sub> than NA samples in terms of the median. In Fig. 4B, transcript levels of COX-1, COX-2, and mPGES-1 are depicted as a function of AAA maximum diameter,



**Fig. 4.** A: Plasma levels of PGE<sub>2</sub> metabolites (PGE<sub>2</sub>M) in controls (Ctrls) (n = 39) and AAA (n = 39) (left), and production of PGE<sub>2</sub>M by NA (n = 15) and AAA samples (n = 32) (right). Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean ± SEM. B: Relative median values of transcript levels of COX-1, COX-2, and mPGES-1 [NA, n = 25; LD (<55 mm), n = 14; MD (55–69.9 mm), n = 37; and HD (≥70 mm), n = 35] normalized to the highest median value of the stratified patient groups. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 when compared with NA samples.

showing that all of them displayed a maximum in the LD group.

#### Coexpression of EP-4 and mPGES-1 in aortic microvessels

In human aortic samples, EP-1 was scarcely expressed and no significant differences were found between NA and AAA. EP-2 and EP-4 were significantly increased in AAA while EP-3 was substantially decreased (Fig. 5). EP-4 immunostaining was not detected in the VSMCs of NA or AAA samples (not shown), but in both samples it colocalized with mPGES-1 in MVECs (Fig. 6). Additionally, EP-4 and mPGES-1 were also detected in the areas of leukocyte infiltration in AAA (Fig. 6). In contrast, none of the other receptors were appreciably expressed in microvessels (not shown). We found few EP-2-positive cells scattered in the media in both NA and AAA, but it was particularly relevant in infiltrating leukocytes in AAA. EP-3-positive cells, that were abundant in the media of NA, decreased in the media of AAA samples according to the depletion of VSMCs in AAA. Nevertheless, many EP-3 immunostained cells were found in the areas of infiltrating leukocytes (not shown).

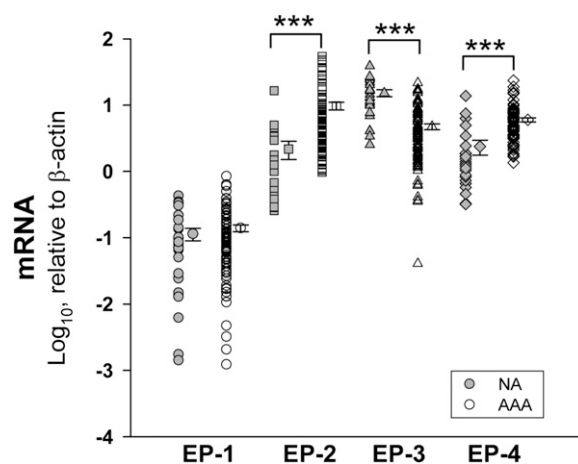
#### EP-4-activation-mediated in vitro angiogenesis

To test the hypothesis that PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis was mediated by EP-4, we performed experiments in MVECs. EP-4 was practically the only EP expressed in MVECs in culture (analyzed by RT-PCR; not shown). Both EP-4 and mPGES-1 were coexpressed in MVECs in culture (Fig. 7A). Exogenously added PGE<sub>2</sub> and Cay10598 (a specific EP-4 receptor agonist) similarly induced angiogenesis, an effect that was abolished by the EP-4 antagonist AH23848 (Fig. 7B). It is well known that IL-1β induces AAc mobilization in addition to COX-2 and mPGES-1 expression. Therefore, to explore whether the endogenous production of PGE<sub>2</sub> by MVECs promoted angiogenesis, we

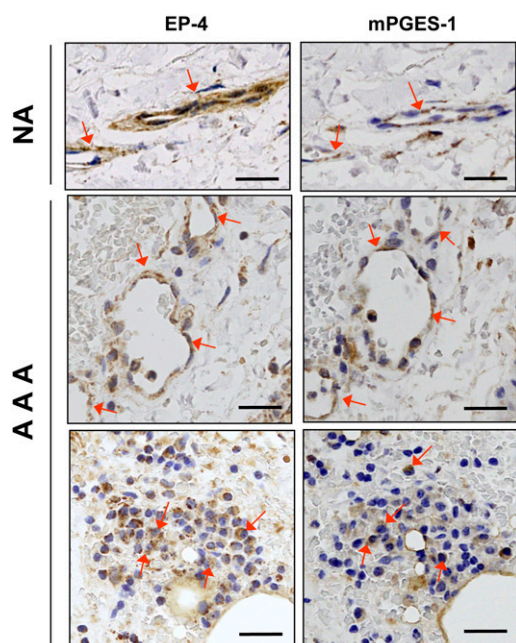
stimulated MVECs with human recombinant IL-1β. IL-1β-induced angiogenesis was also suppressed by AH23848 (Fig. 7B).

## DISCUSSION

This is the first study that analyzes the expression of the PGE<sub>2</sub> pathway as a whole in human AAA. The main objectives were: first, to investigate the expression of mPGES-1 in human AAA which has not been previously reported; second, to tentatively approach the contribution of microvascular endothelium to the bioavailability of PGE<sub>2</sub> in AAA; and third, to highlight the potential contribution of MVEC-derived PGE<sub>2</sub> to the AAA-associated hypervascularization.



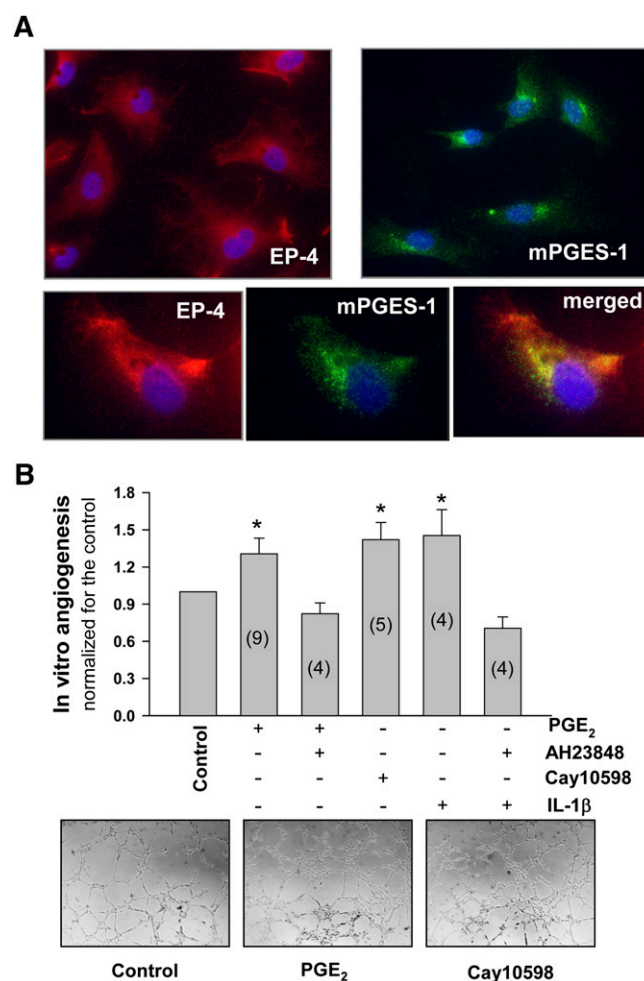
**Fig. 5.** Transcript levels of PGE-receptors (EP) in NA (n = 25) and AAA (n = 86) samples. Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean ± SEM. \*\*\**P* < 0.001 when compared with NA samples.



**Fig. 6.** Representative images of serial sections showing coexpression of EP-4 and mPGES-1 in microvessels of a NA and AAA samples. Arrows indicate some immunostained cells in microvessels and in leukocytes. Scale bars: 50  $\mu$ m.

vWF immunostaining of aortic biopsies showed notable differences between NA and AAA. NA was characterized by a regular distribution of microvessels that cross the vessel wall from the adventitia to the intima. In contrast, AAA exhibited many vessels parallel to the VSMC fibers in addition to adventitia-to-intima ones. The highest density of infiltrating leukocytes in the media was in perivascular areas of these latter microvessels. The enhanced expression of EC markers in AAA was consistent with our immunohistochemistry observations and confirms previous reports showing higher vascularization of AAA (4, 5). After stratification by the aortic diameter, the maximal transcript levels of EC markers were found in the LD group, whereas markers used to estimate leukocyte infiltration exhibited a maximum level in the MD group. These results are in agreement with the previous report by McMillan et al. (29), who found the highest MMP-9 expression in moderate-diameter AAA. Assuming that maximum diameter is an approach to the evolutionary stage of the aneurysmatic lesion, collectively our observations allow us to hypothesize that angiogenesis precedes the maximum inflammatory response during AAA development. A similar concept was proposed by Herron et al. (30) regarding levels of proteinases in AAA.

We found that not only the inducible COX-2 but also the constitutive COX-1 were elevated in AAA. Two main factors may influence relative levels of a particular transcript in heterogeneous cell samples; one is an effective up- or downregulation of its expression in one or more cell types present in the sample, and the other is the alteration of the proportion of cell types expressing that transcript. It is well-known that COX-1 is ubiquitously expressed (6, 7). Therefore, the increase of COX-1 in AAA was probably due to the enhanced proportion of cells with high



**Fig. 7.** A: Immunofluorescent staining of MVECs in culture for EP-4 and mPGES-1 (upper panels), and double staining for EP-4 and mPGES-1 (bottom panels). B: Effect of EP-4 activation on in vitro angiogenesis. MVECs were seeded onto Matrigel in 96-well plates and exposed to 10 nmol/l of PGE<sub>2</sub> or Cay10598 (an EP-4 agonist). AH23848 (200 nmol/l) was used to block EP-4. For IL-1 $\beta$  assays, cells were preincubated or not for 1 h with human recombinant IL-1 $\beta$  (50 U/ml) in the assay medium before being seeded in Matrigel. After 4 h of treatment, photographs (bottom) were taken and the number of closed polygons in the EC mesh was counted. Shaded bars are the mean  $\pm$  SEM (expressed as relative to the corresponding controls). Inside the shaded bars in parentheses is the number of independent experiments performed in triplicate. Representative photographs are also shown (bottom panels). \* $P < 0.05$ , when compared with controls.

COX-1 expression, such as macrophages. Consistent with this notion, an excellent statistical correlation was observed between COX-1 and CD68 in AAA samples ( $R = 0.654$ ,  $P = 2.53 \times 10^{-7}$ ). Our results regarding localization of COX-2 showed that it was highly expressed in vascular cells and infiltrating leukocytes in AAA but weakly expressed in NA. These data strongly suggest that in AAA COX-2 was effectively upregulated in vascular cells included MVECs. We found that, even though significant, the increase of mPGES-1 expression in AAA was not as high as that of COX-2 (1.4-fold vs. 4.3-fold, respectively). This suggests a dissimilar regulation of these two enzymes in AAA, as we previously described (8, 9). A factor that could explain the

modest increase of mPGES-1 found in AAA is the breakdown of VSMCs in AAA. Indeed, VSMCs abundantly express mPGES-1 (9, 10), and we localized mPGES-1 immunoreactivity in all vascular cells including VSMCs in both NA and AAA. The increase in the expression of PGE<sub>2</sub> biosynthetic machinery was also consistent with the higher in vitro production of PGE<sub>2</sub> by the AAA tissues, and with the higher levels of PGE<sub>2</sub> metabolites detected in the plasma of these patients. Nevertheless, the entire increase in plasma levels of PGE<sub>2</sub> may not be coming from the AAA itself, as AAA should be considered a systemic disease of the vasculature (31) and other vascular territories may contribute to the circulating PGE<sub>2</sub> levels.

Several reported biological activities of PGE<sub>2</sub> account for its involvement in AAA physiopathology among others, its ability to induce the expression of MMPs (32) and to inhibit the production of extracellular matrix components such as fibronectin and collagens type I and III (33). The presence of mPGES-1 in a particular cell is necessary for PGE<sub>2</sub> biosynthesis (8–11, 34, 35). In inflammatory diseases it is generally assumed that PGE<sub>2</sub> comes from invading leukocytes, mainly macrophages, and from tumor cells in neoplasias. Nevertheless, we have recently shown that stroma cells present in the tumor environment could be a more relevant source of PGE<sub>2</sub> than tumor cells themselves (28). Because COX-2 and mPGES-1 were expressed in both, vascular cells and infiltrating cells, macrophages could also be a relevant source of PGE<sub>2</sub> in the AAA. Indeed, macrophage COX-2-derived PGE<sub>2</sub> has been found to be relevant in the pathogenesis and rupture of AAAs (12, 13, 21, 22). We cannot rule out, however, the contribution of macrophage-associated COX-1 to the PGE<sub>2</sub> pool, because we found that COX-1 is increased in AAA, probably due to recruited macrophages as mentioned above.

The contributions of the different cell types present in aneurysmatic tissue to the PGE<sub>2</sub> pool is not possible to evaluate directly without seriously modifying tissue samples. As an attempt to approach the contribution of MVECs in the PGE<sub>2</sub> produced by AAA samples, we explored the statistical association of PGE<sub>2</sub> production with other eicosanoids typically released by vascular cells or by leukocytes, considering its production as an independent variable. A statistical association between two variables could indicate either a causal relationship between them, or that the variation of these parameters has a common cause. PGI synthase is expressed in vascular cells but not in leukocytes, TxA synthase is mainly expressed in macrophages and platelets, while 5-lipoxygenase and its counterpart FLAP are expressed in leukocytes (mainly polymorphonuclear). We observed an excellent statistical association between the secretion of PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub>, a modest association between PGE<sub>2</sub> and TxA<sub>2</sub>, and a lack of association between PGE<sub>2</sub> and LTB<sub>4</sub>. The influence of PGI<sub>2</sub> or TxA<sub>2</sub> on PGE<sub>2</sub> levels is unlikely; rather a common cause should underlie these correlations. Therefore, the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> in AAA would be associated with cells producing PGI<sub>2</sub> (vascular cells), and to a lesser extent with those producing TxA<sub>2</sub> (macrophages), suggesting a relevant contribution of MVECs to PGE<sub>2</sub> biosynthesis in these tissues. Nevertheless,

this circumstantial evidence should be corroborated by further studies.

Because EP receptors are critical in the biological action of PGE<sub>2</sub>, we explored those receptors in AAA. The role of EP-3 in angiogenesis is not fully understood (36–39), but EP-2 and EP-4 have been reported to be involved in the release of angiogenic factors and/or angiogenesis in different experimental models and pathologies (40–42). We observed that EP-4 was practically the only PGE receptor detected in MVECs in culture and was mostly expressed in aortic microvessels and some infiltrating leukocytes. In addition, exogenous and endogenous PGE<sub>2</sub> induced angiogenesis in vitro via EP-4 activation. Coexpression of COX-2, mPGES-1, and EP-4 in MVECs is consistent with a role of MVEC-derived PGE<sub>2</sub> in AAA-associated hypervascularization and MVEC-derived PGE<sub>2</sub> could be biologically effective in the AAA-associated angiogenesis in an autocrine manner. Hypervascularization, per se, could be a determinant factor in reducing mechanical strength, because it turns the media layer fluffy and favors leukocyte-mediated matrix degradation besides.

In summary, we provide new evidence concerning the expression of mPGES-1 and the contribution that MVECs could have in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> in human AAA. Our data allow us to speculate that the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in MVEC is relevant for the PGE<sub>2</sub>-mediated hypervascularization of AAA from the early stages of human AAA development. Our data are also consistent with reports showing that suppression of either COX-2, mPGES-1, or EP-4 expression reduces AAA development in animal models (15, 16, 19, 20), and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as alternative targets for therapy in AAA patients. ■

The authors wish to thank Montserrat Gómez and Iris Rodríguez for assistance in the immunohistochemistry studies.

## REFERENCES

1. Weintraub, N. L. 2009. Understanding abdominal aortic aneurysm. *N. Engl. J. Med.* **361**: 1114–1116.
2. Wahlgren, C. M., E. Larsson, P. K. E. Magnusson, R. Hultgren, and J. Swadenborg. 2010. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in twin population. *J. Vasc. Surg.* **51**: 3–7.
3. Choke, E., G. Cockerill, W. R. Wilson, S. Sayed, J. Dawson, I. Loftus, and M. M. Thompson. 2005. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **30**: 227–244.
4. Paik, D. C., C. Fu, J. Bhattacharya, and M. D. Tilson. 2004. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp. Mol. Med.* **36**: 524–533.
5. Choke, E., M. M. Thompson, J. Dawson, W. R. Wilson, S. Sayed, I. M. Loftus, and G. W. Cockerill. 2006. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 2077–2082.
6. Vila, L. 2004. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* **24**: 399–424.
7. Bishop-Bailey, D., J. A. Mitchell, and T. D. Warner. 2006. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 956–958.
8. Solà-Vilà, D., M. Camacho, R. Solà, M. Soler, J. M. Diaz, and L. Vila. 2006. IL-1 $\beta$  induces VEGF, independently of PGE<sub>2</sub> induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells. *Kidney Int.* **70**: 1935–1941.

9. Camacho, M., E. Gerbolés, J. R. Escudero, R. Anton, X. García-Moll, and L. Vila. 2007. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Thromb. Haemost.* **5**: 1411–1419.
10. Soler, M., M. Camacho, J. R. Escudero, M. A. Iníguez, and L. Vila. 2000. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ. Res.* **87**: 504–507.
11. Salvado, M. D., A. Alfranca, A. Escolano, J. Haeggström, and J. M. Redondo. 2009. COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH<sub>2</sub> for transcellular metabolism to PGE<sub>2</sub> by tumor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 1131–1137.
12. Holmes, D. R., W. Wester, R. W. Thompson, and J. M. Reilly. 1997. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* **25**: 810–815.
13. Walton, L. J., I. J. Franklin, T. Bayston, L. C. Brown, R. M. Greenhalgh, G. W. Taylor, and J. T. Powell. 1999. Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in abdominal aortic aneurysms. Implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* **100**: 48–54.
14. King, V. L., D. B. Trivedi, J. M. Gitlin, and C. D. Loftin. 2006. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 1137–1143.
15. Gitlin, J. M., D. B. Trivedi, R. Langenbach, and C. D. Loftin. 2007. Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovasc. Res.* **73**: 227–236.
16. Wang, M., E. Lee, W. Song, E. Ricciotti, D. J. Rader, J. A. Lawson, E. Puré, and G. A. FitzGerald. 2008. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* **117**: 1302–1309.
17. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* **79**: 1193–1226.
18. Tang, E. H., E. Shvartz, K. Shimizu, V. Z. Rocha, C. Zheng, D. Fukuda, G. P. Shi, G. Sukhova, and P. Libby. 2011. Deletion of EP4 on bone marrow-derived cells enhances inflammation and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**: 261–269.
19. Cao, R. Y., T. St Amand, X. Li, S. H. Yoon, C. P. Wang, H. Song, T. Maruyama, P. M. Brown, D. T. Zelt, and C. D. Funk. 2012. Prostaglandin receptor EP4 in abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* **181**: 313–321.
20. Yokoyama, U., R. Ishiwata, M. H. Jin, Y. Kato, O. Suzuki, H. Jin, Y. Ichikawa, S. Kumagaya, Y. Katayama, T. Fujita, et al. 2012. Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PLoS ONE.* **7**: e36724.
21. Chapple, K. S., D. J. Parry, S. McKenzie, K. A. MacLennan, P. Jones, and D. J. Scott. 2007. Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms. *Ann. Vasc. Surg.* **21**: 61–66.
22. Cheuk, B. L., and S. W. Cheng. 2007. Differential secretion of prostaglandin (E(2), thromboxane A(2) and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysm. *Int. J. Mol. Med.* **20**: 391–395.
23. Granström, E., M. Hamberg, G. Hansson, and H. Kindahl. 1980. Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE<sub>2</sub>: the reason for low assay reliability. *Prostaglandins.* **19**: 933–957.
24. Bothwell, W., M. Verburg, M. Wynalda, E. G. Daniels, and F. A. Fitzpatrick. 1982. A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **220**: 229–235.
25. Brú, A., J. C. Souto, S. Alcolea, R. Antón, A. Remacha, M. Camacho, M. Soler, I. Brú, A. Porres, and L. Vila. 2009. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro: possible applications for neutrophil-based anti-tumour treatment. *Mediators Inflamm.* **2009**: 817498.
26. Casós, K., L. Sigüero, M. T. Fernández-Figueras, X. León, M. P. Sardá, L. Vila, and M. Camacho. 2011. Tumor cells induce COX-2 and mPGEs-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc. Res.* **81**: 261–268.
27. Alfranca, A., J. M. López-Oliva, L. Genís, D. López-Maderuelo, I. Mirones, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo, and J. M. Redondo. 2008. PGE<sub>2</sub> induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFβ<sub>1</sub>/Alk5 signaling pathway. *Blood.* **112**: 1120–1128.
28. Alcolea, S., R. Anton, M. Camacho, M. Soler, A. Alfranca, F. X. Aviles-Jurado, J. M. Redondo, M. Quer, X. Leon, and L. Vila. 2012. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub>. *J. Lipid Res.* **53**: 630–642.
29. McMillan, W. D., N. A. Tamarina, M. Cipollone, D. A. Johnson, M. A. Parcker, and W. H. Pearce. 1997. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation.* **96**: 2228–2232.
30. Herron, G. S., E. Unemori, M. Wong, J. H. Rapp, M. H. Hibbs, and R. J. Stoney. 1991. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb.* **11**: 1667–1677.
31. Nordon, I. M., R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson. 2011. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**: 92–102.
32. Corcoran, M. L., W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, and L. M. Wahl. 1992. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 515–519.
33. Varga, J., A. Diaz-Pérez, J. Rosenbloom, and S. A. Jimenez. 1987. PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and II procollagen mRNAs in normal dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**: 1282–1288.
34. Camacho, M., J. López-Belmonte, and L. Vila. 1998. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ. Res.* **83**: 353–365.
35. Camacho, M., and L. Vila. 2000. Transcellular formation of thromboxane A<sub>2</sub> in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb. Res.* **99**: 155–164.
36. Cattaneo, M. G., S. Pola, V. Dehò, A. M. Sanguini, and L. M. Vicentini. 2003. Alprostadil suppresses angiogenesis in vitro and in vivo in the murine Matrigel plug assay. *Br. J. Pharmacol.* **138**: 377–385.
37. Sennlaub, F., F. Valamanesh, A. Vazquez-Tello, A. M. El-Asrar, D. Checchin, S. Brault, F. Gobeil, M. H. Beauchamp, B. Mwaikambo, Y. Courtois, et al. 2003. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation.* **108**: 198–204.
38. Shoji, Y., M. Takahashi, T. Kitamura, K. Watanabe, T. Kawamori, T. Maruyama, Y. Sugimoto, M. Negishi, S. Narumiya, T. Sugimoto, et al. 2004. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut.* **53**: 1151–1158.
39. Katoh, H., K. Hosono, Y. Ito, T. Suzuki, Y. Ogawa, H. Kubo, H. Kamata, T. Mishima, H. Tamaki, H. Sakagami, et al. 2010. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am. J. Pathol.* **176**: 1469–1483.
40. Seno, H., M. Oshima, T. O. Ishikawa, H. Oshima, K. Takaku, T. Chiba, S. Narumiya, and M. M. Taketo. 2002. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* **62**: 506–511.
41. Mutoh, M., K. Watanabe, T. Kitamura, Y. Shoji, M. Takahashi, T. Kawamori, K. Tani, M. Kobayashi, T. Maruyama, K. Kobayashi, et al. 2002. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **62**: 28–32.
42. Rao, R., R. Redha, I. Macias-Perez, Y. Su, C. Hao, R. Zent, M. D. Breyer, and A. Pozzi. 2007. Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **282**: 16959–16968.

# Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms

J.-F. Dilmé<sup>a,b</sup>, S. Bellmunt<sup>a,b</sup>, M. Camacho<sup>a,\*</sup>, D. Solà-Vilà<sup>c</sup>, J.-M. Romero<sup>a,b</sup>, J.-R. Escudero<sup>a,b</sup>, L. Vila<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Vascular Surgery Department, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Autonomous University of Barcelona, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain

## WHAT THIS PAPER ADDS

The results in this paper indicate that active smoking influences vascular cells to increase MMP-2 expression, which contributes to expansion and the rupture risk of AAA. This finding prompts more aggressive control of cardiovascular risk factors in the very early phase of the disease, and particularly AAA screening in smokers. This could even modify monitoring guidelines for AAA in the non-surgical range, and the approach should be more aggressive in patients who continue to smoke. It allows for the possibility that active smokers have a higher risk of rupture than those with the same arterial diameter who do not smoke or who have stopped smoking.

**Objective:** To evaluate the influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms (AAA).

**Methods:** Aortic samples were collected from patients who underwent AAA repair ( $n = 89$ ). Patients were stratified according to the maximum transverse aorta diameter: small diameter (<55 mm), moderate diameter (55–69.9 mm) and large diameter ( $\geq 70$  mm). Aortic walls were studied using real-time PCR and immunohistochemistry. MMP-2, MMP-9,  $\alpha$ -actin, CD45, and CD68 transcript levels were determined relative to  $\beta$ -actin. Quantitative data were expressed as median (IQ-range).

**Results:** No differences were found in MMP-2 expression between the patient groups, which was mainly associated with vascular smooth muscle cells (VSMC); however, MMP-9 displayed the maximum level in the moderate-diameter group, associated with infiltrating macrophages. Current smoking (CS) and renal insufficiency (RI) significantly increased local levels of MMP-2 (CS 349.5 [219.5–414.1] vs. no-CS 184.4 [100.0–320.5];  $p < .008$ ; RI 286.8 [189.6–410.8] vs. no-RI 177.3 [99.3–326.9];  $p = .047$ ). Nevertheless, after stepwise linear regression analysis only CS remained as an independent variable predicting local levels of MMP-2 ( $p = .002$ ). No risk factors influenced local levels of MMP-9.

**Conclusions:** The results show that local levels of MMP-2, an important factor for AAA development, were increased in current smoking AAA patients. MMP-2 was mainly associated with VSMC. It is suggested that MMP-2 could contribute significantly to the increased AAA growth rate observed in current smoking patients. These findings support inclusion of smokers in screening for aneurysmal disease, and emphasize the need for more aggressive monitoring of aneurysmal disease outside the surgical range in patients who smoke at the time of diagnosis and in those who continue to smoke during follow-up.

© 2014 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article history: Received 30 January 2014, Accepted 27 May 2014, Available online XXX

**Keywords:** Abdominal aortic aneurysm, MMP-2, Cardiovascular risk factors, Tobacco smoking

## INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common, late age onset disorder in industrialized countries. Rupture of AAA has very high mortality rates. Screening studies have suggested that the prevalence of AAA in older men is about 5%.<sup>1</sup> Despite the aging of the population, the prevalence,

incidence, and global mortality rate of AAA appear to have declined as a result of increased elective AAA repair, lower mortality from emergency repair, and a greater proportion of emergency admissions being offered emergency repair.<sup>2,3</sup>

The etiology of AAA is complex, but environmental and genetic factors are known to contribute to the risk.<sup>4,5</sup> The relationship between AAA and atherosclerosis is intriguing. Both disorders share some common features and AAA usually occurs in atherosclerotic individuals. Not only are there evident histopathological differences between AAA and atherosclerotic lesions, but differences have also been observed in cardiovascular risk factors. Diabetes, for example, is a well-established risk factor for atherosclerosis,

\* Corresponding author. M. Camacho, Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory of the Institute of Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau, c/Antonio M<sup>o</sup> Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.

E-mail address: [mcamacho@santpau.cat](mailto:mcamacho@santpau.cat) (M. Camacho).

1078-5884/\$ — see front matter © 2014 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>



but it has been reported to be protective for AAA,<sup>6,7</sup> whereas smoking seems to be a substantially greater risk factor for AAA than for atherosclerosis,<sup>7,8</sup> and chronic occlusive pulmonary disease (COPD) has been associated with AAA.<sup>9</sup>

Current evidence on the pathogenesis of AAA indicates that aortic wall inflammation and proteolytic degradation of the aortic wall play a fundamental role in the evolution and progression of the disease. A number of reports have documented increased expression of matrix metalloproteinases (MMP) in AAA, and genetic variants have been proposed to be associated with AAA.<sup>10</sup> The MMPs most prominently associated with AAA are MMP-2 (Gelatinase A) and MMP-9 (Gelatinase B),<sup>11–14</sup> both of which display elastolytic activity and similar proteolytic activity.<sup>15</sup> One fundamental characteristic of AAA is the hypervascularization of aortic tissue. It has been proposed that this vascularization might contribute to the development of aneurysms<sup>16</sup> and could play a causative role in the genesis of AAA.<sup>11,17</sup> As several studies have pointed to the essential role of MMP-2 and MMP-9 in the onset of angiogenesis,<sup>18,19</sup> local levels of MMP-2 and MMP-9 could be relevant in AAA progression.

Information is lacking on the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMPs in AAA. The aim of the present study was to evaluate the influence of the major cardiovascular risk factors on MMP-2 and MMP-9 levels in human AAA.

## METHODS

### Patients

The inclusion criteria for this study were patients undergoing elective open repair for atherosclerotic AAA. An infrarenal aorta biopsy was taken during the intervention. The exclusion criteria were absent or inadequate aortic biopsy and patients with pseudoaneurysms, or infectious or inflammatory aneurysms. Patients were stratified according to the maximum transverse aorta diameter determined by the use of a measurement transverse to the true lumen center line at infrarenal level, based on angio-CT with endovenous contrast, using Workstation AGFA IMPAX 6.4.0.4010 and OsiriX MD, FDA Cleared/CE IIa version, as a primary diagnostic. Three groups were defined: small diameter (SD, <55 mm), moderate diameter (MD, 55–69.9 mm) and large diameter (LD, ≥70 mm). Surgical repair is not usually indicated when the maximum transverse aortic diameter is <55 mm. The SD samples in this study were obtained from patients with maximum transverse aorta diameter <55 mm, who underwent surgery for a symptomatic or rapidly growing AAA (>5 mm/6 month or >10 mm/year) or for repair of a concomitant iliac artery aneurysm.

All patients underwent surgery at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP). The study was approved by the local ethics committee, and patients gave written informed consent prior to surgery. All procedures were reviewed by the institutional review board at HSCSP. The study

conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. Clinical outcomes were taken from the clinical database.

### Tissue samples

Biopsies were systematically obtained from the antero-lateral wall of the remaining mid-infrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic replacement of the AAA, at the level of the inferior mesenteric artery. Luminal thrombi, if present, were separated before the aortic biopsy was taken. Biopsies were processed immediately. A portion of each sample was placed in RNAlater solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4 °C for 24 hours before long-term storage at –80 °C until further processing for RNA isolation. When possible, another portion was fixed in 10% formalin solution (Sigma-Aldrich, Inc St Louis, MO, USA) for 24 hours and embedded in paraffin for microscopic studies to locate the MMPs.

### Endothelial cells and VSMC culture

Aortic human VSMC cultures were established from multi-organ donor aortas using an explant procedure as previously described.<sup>20,21</sup> VSMC were characterized by  $\alpha$ -actin positive staining and used at passage 4–6. Endothelial cells were isolated by collagenase digestion from human umbilical cord veins (HUVEC) and cultured as previously described.<sup>22</sup> Cells were characterized by vWF positive staining and used at the first passage.

### Risk factors

The risk factor definitions used in this study were: diabetes mellitus: glycated hemoglobin >5.8% or use of oral antidiabetic drugs or insulin; arterial hypertension (HTN): systolic blood pressure ≥140 mm Hg, diastolic blood pressure ≥80 mm Hg or use of antihypertensive medication; hyperlipidemia: a total cholesterol >6.2 mmol/L, LDL cholesterol >1.70 mmol/L or triglycerides >1.65 mmol/L; smoking was categorized into two groups: current smoking (CS): smokers and ex-smokers stopped smoking <1 year, and non-current smoking (N-CS): never-smoked and ex-smokers stopped smoking >1year; COPD: FEV1/FVC <0.7; and renal insufficiency (RI): estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated with the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation considering values of eGFR ≤60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> as RI.<sup>23</sup>

### Analysis of mRNA levels in tissues and culture cells

Tissues were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. For culture cells, total RNA was extracted using Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcribing 1 µg RNA with a High-Capacity cDNA Archive Kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). mRNA expression of the selected

genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT using pre-designed validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/ $\beta$ -actin ratios.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using a mouse monoclonal antibody against MMP-2 (ref ab1818, diluted 1:15) from Abcam and a rabbit polyclonal antibody anti-MMP-9 (ref A0150, diluted 1:50) from Dako. Three-micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex Kit. Diaminobenzidine was used as chromogen.

### Double-fluorescence immunostaining

For antigen co-localization studies, double-fluorescence immunostaining was performed using a sequential method. After deparaffinization and antigen retrieval, blocking for non-specific binding was performed at 4 °C overnight. Appropriate concentrations of antibodies were then sequentially applied for 1 hour at room temperature, with PBS washing after each incubation. Slides were first incubated with anti-MMP-2 or anti-MMP-9 antibodies followed by incubation with Alexa Fluor 488 goat-antimouse IgG (diluted 1/200; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, MMP-2 slides were incubated with anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ref ab5694, diluted 1:200, Abcam), and MMP-9 slides with CD45 or CD68 (IR751 and IR7613, without further dilution, Dako), followed by incubation with Alexa Fluor 555 donkey-antirabbit IgG (diluted 1/200; Life Technologies). As a negative control, sections were incubated omitting primary antibodies. Samples were then mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Life Technologies Co, Eugene, OR, USA). Images were obtained using an SP5 Leica confocal microscope.

### Statistical analysis

An exploratory study was performed to detect the relationship between cardiovascular risk factors and levels of MMP-2 and MMP-9. SPSS and Sigma-Plot software were used for statistical analysis. All data regarding transcript levels are expressed relative to  $\beta$ -actin  $\times 1000$ . All quantitative data in this study were non-normally distributed and expressed as median (25th–75th percentile). The Mann–Whitney Rank Sum Test was used to compare two groups and Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks for multiple comparisons. Bonferroni's correction was applied to adjust significance values in multiple testing. Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data was used to evaluate the association between continuous variables with non-normal distribution. A logarithmic transformation was applied to outcomes without a normal distribution before data analysis using linear regression tests, with an interaction analysis,

including the effect of the identified risk factors and controlling for possible confounding factors. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered significant.

### RESULTS

From 2008 to 2012, elective abdominal aortic aneurysm surgery was performed in 225 patients at the Department of Vascular and Endovascular Surgery of the HSCSP in Barcelona, Spain. A total of 166 patients underwent open surgery and 59 had endovascular aortic repair (EVAR). The study group was made up of 89 of the 166 patients who underwent open surgery. Table 1 shows patient demographics.

### Expression of MMP-2 and MMP-9

To evaluate levels of MMPs at different stages of AAA development, AAA patient samples were stratified as a function of the maximum transverse aorta diameter (see

**Table 1.** Demographics for AAA included in the study.

Total number patients	89
Aortic diameter (mm) <sup>a</sup>	66 $\pm$ 12.7
SD (<55 mm)	49.9 $\pm$ 6.5
MD (55–69.9 mm)	59.9 $\pm$ 3.3
LD ( $\geq 70$ mm)	80.2 $\pm$ 6.9
Age (years)	71.1 $\pm$ 6.5
Male	87 (97.8)
Diabetes mellitus	19 (21.3)
Hypertension	63 (70.8)
Hyperlipidemia	54 (60.7)
Smoking habit	
Non-current smokers <sup>b</sup>	63 (70.8)
Current smokers	26 (29.2)
Coronary artery disease	20 (22.4)
Angina pectoris	2 (2.2)
Myocardial infarction	6 (6.7)
Coronary intervention/CABG	12 (13.5)
Chronic renal insufficiency	34 (38.2)
Dialysis	0
Peripheral vascular disease	48 (53.9)
Absent pulses	31 (34.8)
Intermittent claudication	17 (19.1)
Cerebrovascular disease	7 (7.9)
Cerebral vascular attack	4 (4.5)
Transient ischemic attack	3 (3.4)
COPD	26 (29.2)
Antiplatelet users	47 (53.4)
Statin users	57 (64)
ACE inhibitor users	23 (20.7)
NSAID users	6 (6.7)
Corticoid users	6 (6.7)
Immuno-suppressors	4 (3.5)

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean  $\pm$  SD. ACE = angiotensin converting enzyme; CABG = coronary artery bypass grafting; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LD = large diameter; MD = moderate diameter; NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drugs; SD = small diameter.

<sup>a</sup> Aneurysm maximum transverse diameter in mm.

<sup>b</sup> Quit smoking  $> 1$  year.

Table 1 for the range of the groups). Levels of mRNA of either MMP-2 or MMP-9 did not fit a normal distribution. Regarding expression of MMP-2, no significant differences were observed between stratified groups of patients, whereas MMP-9 mRNA levels were statistically higher in the MD group (Fig. 1).

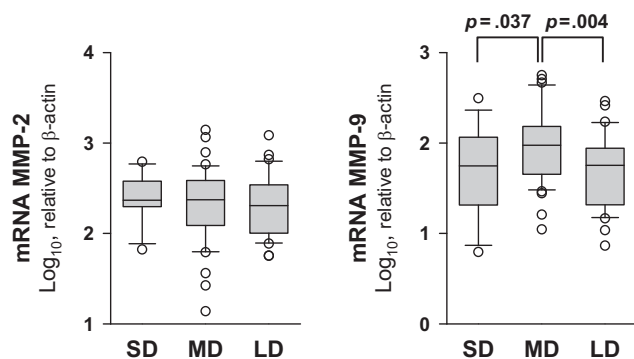
#### Localization of MMP-2 and MMP-9

Immunohistochemistry showed that MMP-2 was widely expressed in AAA samples, with MMP-2 immunostaining mainly found in medial VSMC (Fig. 2A) Additionally, MMP-2 was occasionally found in infiltrating leukocytes. Next, the correlation was determined between mRNA levels of MMP-2 and those of VSMC and leukocyte markers. The correlation between MMP-2 and  $\alpha$ -actin (VSMC marker) was very significant, that between MMP-2 and CD68 (a macrophage marker) was much less significant, and that between MMP-2 and CD45 (pan-leukocyte marker) was not significant (Table 2). The mRNA levels of MMP-2 in HUVEC and VSMC in culture were also examined, and MMP-2 was detected in both vascular cell types (not shown). In immunofluorescent double staining, co-expression of MMP-2 and  $\alpha$ -actin was observed in some microvessels (Fig. 2B). Nevertheless, the co-expression of these proteins was found mainly in VSMC of the media layer (Fig. 2C).

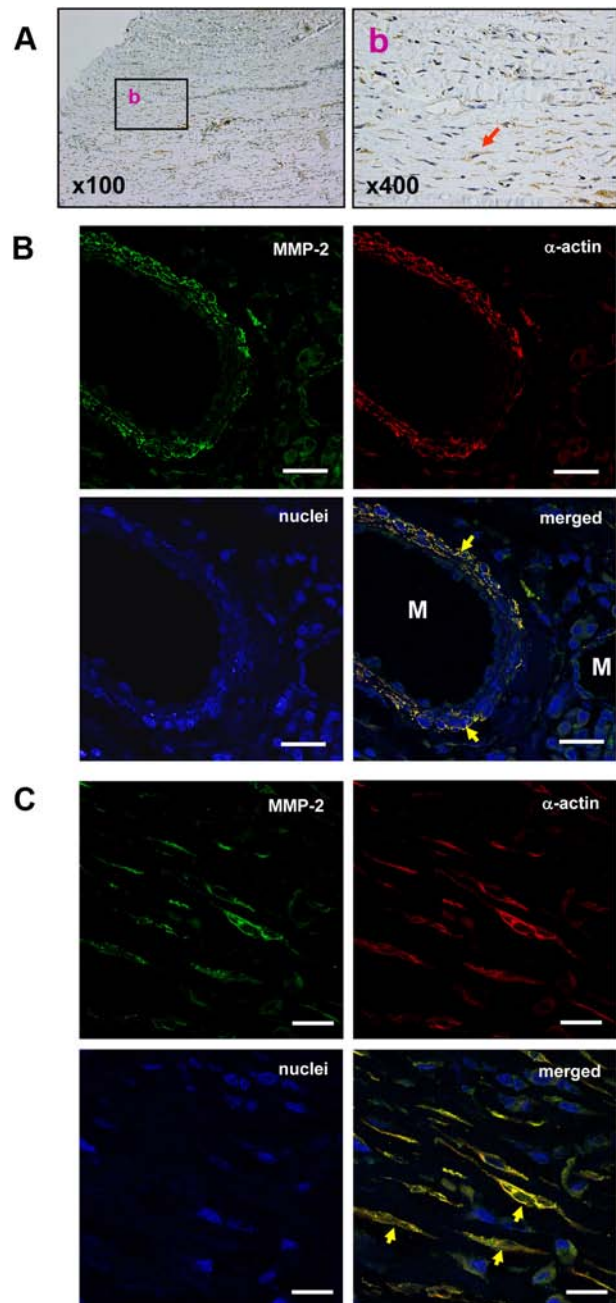
Immunostaining with anti-MMP-9 was found in infiltrating leukocytes in AAA (Fig. 3A). No statistical association was found between MMP-9 and  $\alpha$ -actin, but a significant correlation was found between MMP-9 and leukocyte markers, with the highest correlation being between MMP-9 and CD68 (Table 2). MMP-9 was not detected in either HUVEC or VSMC in culture (not shown). Immunofluorescence showed that MMP-9 co-expressed with CD45 in some cells (Fig. 3B), but mainly with CD68 (Fig. 3C).

#### Influence of risk factors on MMP-2 and MMP-9 transcript levels

When AAA patients were stratified according to risk factors it was found that MMP-2 transcript levels were statistically higher in CS than in N-CS (Table 3). As described in the



**Figure 1.** Expression levels of MMP-2 and MMP-9 in stratified patient groups as a function of the maximum aorta diameter; SD: <55 mm,  $n = 14$ ; MD: 55–69.9 mm,  $n = 42$ ; and LD:  $\geq 70$  mm,  $n = 33$ .



**Figure 2.** (A) Representative immunohistochemistry images of MMP-2 in AAA samples. Arrows show medial VSMC immunostained with anti-MMP-2. (B) Representative immunofluorescent double staining for MMP-2 and  $\alpha$ -actin of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show double immunostained cells; M indicates the light of microvessels; bars are 25  $\mu$ m. (C) Representative immunofluorescent double staining for MMP-2 and  $\alpha$ -actin of non-infiltrated area in the media layer. Arrows show some double immunostained cells; bars are 15  $\mu$ m.

Methods, the N-CS group consisted of both never-smoked and ex-smokers. In previous statistical analysis, the CS group was different from ex- and never-smoked groups regarding MMP-2. As there were no differences between these two groups regarding MMP-2 in this study, they were joined to increase statistical power as there were only seven never-smokers. Patients with RI also exhibited a higher

**Table 2.** Correlation values between mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 and those of VSMC or leukocyte markers.

	n	MMP-2		MMP-9	
		R	$p^a$	R	$p^a$
$\alpha$ -actin	86	.512	$1.7 \times 10^{-6}$	.148	.665
CD45	86	.191	.365	.319	.012
CD68	66	.382	.012	.609	$3.56 \times 10^{-7}$

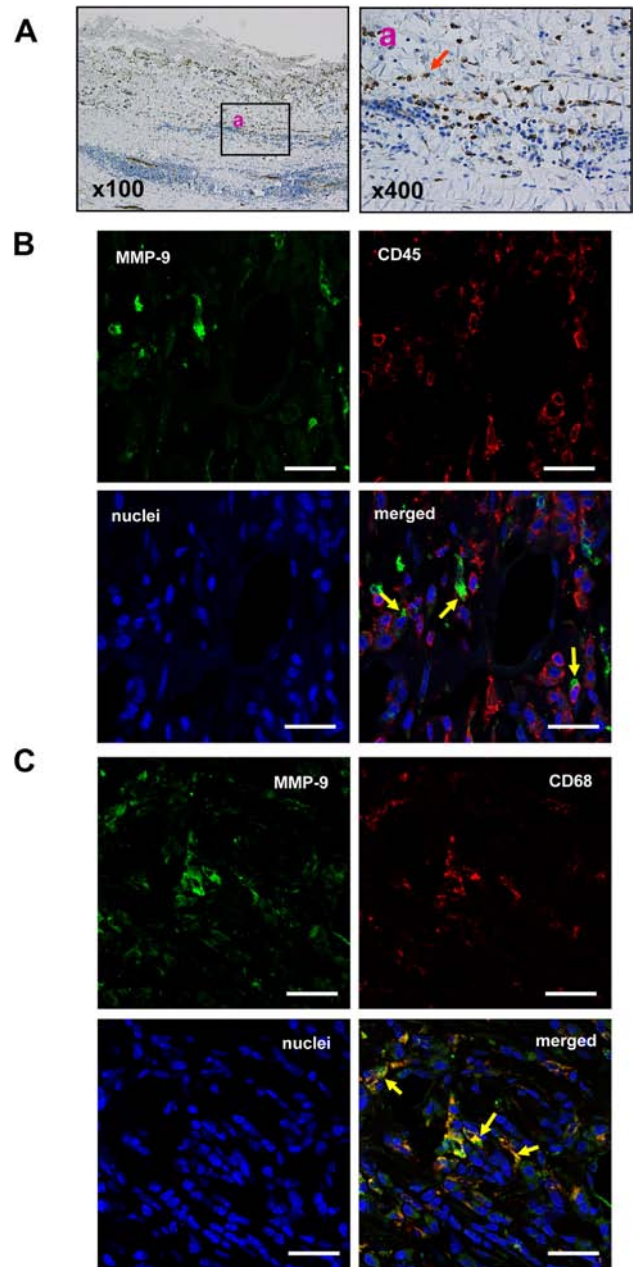
<sup>a</sup> Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data and Bonferroni's correction for multiple testing was applied.

MMP-2 expression than patients with normal eGFR. No differences in MMP-2 levels were found between the groups regarding the other risk factors. The association between risk factors was then evaluated. After  $\chi^2$  analysis, CS, HTN, COPD, and RI were identified as possibly related variables (Table 4). A logarithmic transformation was applied to the outcomes of MMP2 and eGFR, which did not fit a normal distribution prior to the multiple linear regression analysis. Despite the statistical significance in the univariate analysis, the multiple linear regression analysis ruled out a relationship between MMP2 and RI and no interaction was detected (Table 4). After stepwise linear regression analysis, only CS ( $p = .002$ ) remained an independent variable predicting MMP-2 levels; and the final model was:  $\text{LogMMP-2} = 2.242 + 0.259 \cdot \text{CS}$ ;  $R = .329$ . Calculating the antilogarithms, the predicted level of MMP-2 of the N-CS was 174.54 and of the CS was 316.66. No differences were found in the expression of MMP-9 between the AAA risk factor groups (Table 3).

## DISCUSSION

This study describes the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMP-2 and MMP-9 in human aneurysmal aorta. The main characteristics that distinguish AAA from atherosclerosis are proteolytic degradation of elastic fibers, VSMC depletion, and hypervascularization of aortic tissue. In these processes, MMPs, in particular MMP-2 and MMP-9, play a fundamental role.<sup>11,16–19</sup>

Previous reports show increased MMP-2 and MMP-9 levels in AAA.<sup>11–14</sup> In this study, when patients were stratified according to maximum AAA diameter, levels of the two MMPs transcripts displayed different patterns: whereas MMP-2 levels were similar in all diameter-stratified groups, MMP-9 showed maximum expression in the MD group. Previous reports have shown maximal expression of MMP-2 in small AAA and MMP-9 in medium size AAA.<sup>13,14</sup> These results are also consistent with a previous report showing that expression of CD45, MMP-9, and five lipoxigenase activating protein, another leukocyte associated protein, was significantly enhanced in AAA patients, with maximal expression in the MD group.<sup>17</sup> In the present study, immunohistochemistry showed that MMP-2 and MMP-9 also differed in cellular localization. Whereas MMP-2 was expressed mainly in medial VSMC, MMP-9 was detected only in the infiltrating leukocytes. Transcript findings supported these data. A good correlation was found between



**Figure 3.** (A) Representative immunohistochemistry images of MMP-9 in AAA. Arrows show medial infiltrating leukocytes immunostained with anti-MMP-9. (B) Representative immunofluorescent double staining for MMP-9 and CD45 of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show some double immunostained cells; bars are 25  $\mu\text{m}$ . (C) Representative immunofluorescent double staining for MMP-9 and CD68 of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show some double immunostained cells; bars are 25  $\mu\text{m}$ .

MMP-2 and  $\alpha$ -actin transcript levels, whereas correlation of MMP-2 with leukocyte markers was weak. In contrast, MMP-9 showed a correlation with transcript levels of the leukocyte markers CD45 and CD68, with the best correlation being between MMP-9 and CD68. Taken together, these results indicate that MMP-2 was mainly associated with VSMC and, as reported by Newman et al.,<sup>24</sup> MMP-9 was associated with infiltrating leukocytes, mainly macrophages.

**Table 3.** Transcript levels of MMP-2 and MMP-9 in AAA samples stratified by cardiovascular risk factors.

	Median	25th–75th percentile	<i>p</i> vs. no-factor <sup>a</sup>
<b>MMP-2</b>			
No current smoking	184.4	100.0–320.5	
Current smoking	349.5	219.5–414.1	.008
No renal insufficiency	177.3	99.3–326.9	
Renal insufficiency	286.8	189.6–410.8	.047
No hypertension	232.7	170.2–335.8	
Hypertension	216.2	109.5–394.8	>.999
No diabetes mellitus	217.0	132.6–351.4	
Diabetes mellitus	224.3	86.5–394.1	>.999
No hyperlipidemia	219.5	104.7–347.3	
Hyperlipidemia	221.0	132.6–363.4	>.999
No COPD	207.0	109.5–334.9	
COPD	232.4	170.0–404.3	.743
<b>MMP-9</b>			
No current smoking	67.2	38.8–122.5	
Current smoking	61.7	35.4–110.1	>.999
No renal insufficiency	64.9	38.1–119.1	
Renal insufficiency	75.8	29.1–120.2	>.999
No hypertension	65.6	37.8–110.1	
Hypertension	66.0	34.3–123.0	>.999
No diabetes mellitus	67.7	38.1–119.1	
Diabetes mellitus	60.9	31.3–120.2	>.999
No hyperlipidemia	72.8	41.6–143.3	
Hyperlipidemia	62.2	26.6–115.0	.957
No COPD	64.1	39.0–135.6	
COPD	67.1	26.6–105.3	>.999

Data are expressed as relative to  $\beta$ -actin  $\times$  1000. COPD = chronic obstructive pulmonary disease.

<sup>a</sup> Mann–Whitney Rank Sum test and Bonferroni's correction for multiple testing was applied.

This study provides further evidence that MMP-2 and MMP-9 may not be regulated by the same mechanisms and may therefore have different roles in AAA development.<sup>11–14</sup> It has been postulated that MMP-2 plays a role in the expansion of AAA and MMP-9 in the progression towards rupture.<sup>12</sup>

Although AAA and atherosclerosis are related inflammatory diseases, not all cardiovascular risk factors for atherosclerosis are associated with AAA. Differences were found regarding the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMP-2 and MMP-9 in AAA. None of the evaluated risk factors influenced local levels of MMP-9. In contrast, univariate analysis indicated that CS and RI patients had higher MMP-2 levels in the aneurysmal aorta than N-CS and non-RI individuals. Many reports provide evidence supporting an association between renal function and atherosclerosis, and eGFR is an independent prognostic factor for cardiovascular disease.<sup>25</sup> It was recently reported that eGFR is an excellent predictor of vascular events in patients with peripheral arterial disease.<sup>26</sup> Taking solely the univariate statistical analysis of RI data and MMP-2 expression into account, it could be concluded that the degree of atherosclerosis influenced MMP-2 levels. Nevertheless, multiple linear regression analysis indicated that the influence of RI, in terms of eGFR, on MMP-2 local levels was weak, if present at all. Taken together, these results suggest that the effect of smoking on local levels of MMP-2 is independent of the atherosclerotic and COPD states in AAA patients. Indeed, it has previously been reported that the association of COPD and AAA is unrelated to smoking.<sup>9</sup>

Smoking is a particularly relevant risk factor for AAA.<sup>27</sup> It has been reported that the association between smoking and AAA is 2.5-fold higher than the association between smoking and coronary heart disease.<sup>8</sup> Tobacco smoke also

**Table 4.** Association between risk factors and multiple linear regression analysis; MMP-2 as independent variable.

$\chi^2$ analysis of risk factors					
Variable	COPD	CS	DM	HL	RI
HTN	$\chi^2 = 1.494$ $p = .222$	$\chi^2 = 3.371$ $p = .066$	$\chi^2 = 1.801$ $p = .180$	$\chi^2 = 0.032$ $p = .859$	$\chi^2 = 4.448$ $p = .035$
COPD		$\chi^2 = 8.464$ $p = .004$	$\chi^2 = 0.001$ $p = .981$	$\chi^2 = 0.082$ $p = .775$	$\chi^2 = 9.952$ $p = .002$
CS			$\chi^2 = 0.033$ $p = .857$	$\chi^2 = 0.001$ $p = .976$	$\chi^2 = 1.223$ $p = .269$
DM				$\chi^2 = 2.55$ $p = .110$	$\chi^2 = 0.040$ $p = .842$
HL					$\chi^2 = 0.003$ $p = .957$
Multiple linear regression					
Log <sub>10</sub> (MMP-2) = a <sub>0</sub> + a <sub>1</sub> ·CS + a <sub>2</sub> ·Log <sub>10</sub> (eGFR) + a <sub>3</sub> ·COPD + a <sub>4</sub> ·HTN; R = 0.378381					
Variable	Coefficient	Coefficient value	Coefficient Std. Error	<i>p</i>	
	a <sub>0</sub>	2.885	0.434	<.001	
CS	a <sub>1</sub>	0.206	0.087	.019	
eGFR	a <sub>2</sub>	−0.339	0.220	.126	
COPD	a <sub>3</sub>	0.044	0.088	.615	
HTN	a <sub>4</sub>	−0.049	0.088	.576	

COPD = chronic obstructive pulmonary disease; CS = current smoking; DM = diabetes mellitus; HL = hyperlipidemia; HTN = arterial hypertension; RI = renal insufficiency.

enhances AAA formation in animal models.<sup>28,29</sup> A statistically significant difference was found between CS and N-CS regarding MMP-2, and this was maintained after introducing RI, HTN, and COPD as confounding variables into the statistics. From the present data, it seems that MMP-2 is mainly linked to the VSMC state, whereas local levels of MMP-9 appear to depend more on the inflammatory infiltrate in the aortic wall. This suggests that smoking affects the state of VSMC rather than the degree of leukocyte infiltration. As MMP-2 plays a role in the expansion of AAA,<sup>12</sup> the present results suggest that it could significantly contribute to the increased AAA growth rate observed in the smoking patients.<sup>7</sup>

Several studies on the biochemical effects of tobacco smoke are available. Water-soluble tobacco smoke extract has been found to induce MMP-1 expression in endothelial cells and neutrophil elastase in AAA.<sup>30,31</sup> It has also been observed that nicotine induces AAA in an animal model through activation of AMP activated protein kinase alpha2.<sup>32</sup> Nevertheless, more research is needed to ascertain the molecular species and signaling pathways involved in the effect of tobacco smoke on MMP-2 expression in human AAA, particularly in VSMC.

In conclusion, the present work shows that current smoking patients had higher MMP-2 levels than non-current smokers. However, no correlation was found between MMP-9 and smoking. These results add further evidence for the role of tobacco smoking in AAA development, supporting the need to include smokers in AAA screening, and to implement more aggressive monitoring of aneurysmal disease outside the surgical range (<5.5 cm) in patients who smoke at the time of diagnosis and in those who continue to smoke during follow-up. More research is needed to elucidate the pathways involved in the regulation of MMP-2 expression by tobacco smoke in AAA, particularly in VSMC.

## FUNDING

This study was supported partially by grants SAF2010/21392, and Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) — Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

## CONFLICT OF INTEREST

None.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laura Sigüero, Sonia Alcolea, Montserrat Gómez, and Iris Rodríguez for their excellent technical support, Angel Martínez for his expert statistical advice, and Catolyn Newey for the language revision.

## REFERENCES

- Cornuz J, Sidoti PC, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health* 2004;**14**:343–9.
- Anjum A, Powell JT. Is the incidence of abdominal aortic aneurysm declining in the 21st century? Mortality and hospital admissions for England & Wales and Scotland. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;**43**:161–6.
- Anjum A, von Allmen R, Greenhalgh R, Powell JT. Explaining the decrease in mortality from abdominal aortic aneurysm rupture. *Br J Surg* 2012;**99**:637–45.
- Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011;**8**:92–102.
- Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PKE, Hultgren R, Swadenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in twin population. *J Vasc Surg* 2010;**51**:3–8.
- Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJA. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;**39**:200–7.
- Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. RESCAN Collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 2012;**99**:655–65.
- Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg* 2003;**38**:329–34.
- Meijer CA, Kokje VB, van Tongeren RB, Hamming JF, van Bockel JH, Möller GM, et al. An association between chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm beyond smoking: results from a case-control study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;**44**:153–7.
- Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. Heart published online first 27 June 2013. PMID:23813847.
- Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;**11**:1667–77.
- Petersen E, Wagberg F, Angquist KA. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;**23**:153–7.
- Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;**15**:1145–51.
- McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parcker MA, Pearce WH. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;**96**:2228–32.
- Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008;**29**:290–308.
- Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp Mol Med* 2004;**36**:524–33.
- Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, Rodriguez C, Bellmunt S, Sigüero L, et al. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res* 2013;**54**:3506–15.
- Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;**58**:1048–51.

- 19 Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;**2**:737–44.
- 20 Camacho M, Gerbolés E, Escudero JR, Anton R, García-Moll X, Vila L. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemostas* 2007;**5**: 1411–9.
- 21 Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iñiguez MA, Vila L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res* 2000;**87**:504–7.
- 22 Camacho M, Godessart N, Antón R, García M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem* 1995;**270**: 17279–86.
- 23 Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro 3rd AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;**150**:604–12.
- 24 Newman KM, Jean-Cloude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, et al. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 1994;**20**:814–20.
- 25 Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;**351**:1296–305.
- 26 Romero JM, Bover J, Fite J, Bellmunt S, Dilme JF, Camacho M, et al. The MDRD-4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2012;**56**:1324–30.
- 27 Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;**33**:1473–7.
- 28 Stolle K, Berges A, Lietz M, Lebrun S, Wallerath T. Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice. *Toxicol Lett* 2010;**199**:403–9.
- 29 Buckley C, Wyble CW, Borhani M, Ennis TL, Kobayashi DK, Curci JA, et al. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Am Coll Surg* 2004;**199**:896–903.
- 30 Lemaître V, Dabo AJ, D'Armiento J. Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mTOR signaling. *Toxicol Sci* 2011;**123**: 542–9.
- 31 Murphy EA, Danna-Lopes D, Sarfati I, Rao SK, Cohen JR. Nicotine-stimulated elastase activity release by neutrophils in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1998;**12**:41–5.
- 32 Wang S, Zhang C, Zhang M, Liang B, Zhu H, Lee J, et al. Activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha 2$  by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med* 2012;**18**:902–10.

## Research Article

# Active Smoking Increases Microsomal PGE<sub>2</sub>-Synthase-1/PGE-Receptor-4 Axis in Human Abdominal Aortic Aneurysms

Jaime-Félix Dilmé,<sup>1,2</sup> David Solà-Vilà,<sup>3</sup> Sergi Bellmunt,<sup>1,2</sup> José-María Romero,<sup>1,2</sup> José-Román Escudero,<sup>1,2</sup> Mercedes Camacho,<sup>1</sup> and Luis Vila<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Vascular Surgery Department, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Autonomous University of Barcelona, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Mercedes Camacho; [mcamacho@santpau.cat](mailto:mcamacho@santpau.cat)

Received 19 January 2014; Accepted 10 April 2014; Published 30 April 2014

Academic Editor: Jonathan Peake

Copyright © 2014 Jaime-Félix Dilmé et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** The cyclooxygenase- (COX-) 2/microsomal PGE-synthase- (mPGES-) 1/PGE-receptor- (EP-) 4 axis could play a key role in the physiopathology of abdominal aortic aneurysm (AAA) in humans. In this study, we investigated the influence of cardiovascular risk factors on the expression of the PGE<sub>2</sub> pathway in human AAA. **Methods.** Aortic ( $n = 89$ ) and plasma ( $n = 79$ ) samples from patients who underwent AAA repair were collected. Patients were grouped according to risk factors. COX-isoenzymes, mPGES-1, EPs,  $\alpha$ -actin, and CD45 and CD68 transcripts levels were quantified by QRT-PCR and plasma PGE<sub>2</sub> metabolites by EIA. **Results.** Current smoking (CS) patients compared to no-CS had significantly higher local levels of mPGES-1 ( $P = 0.009$ ), EP-4 ( $P = 0.007$ ), and PGE<sub>2</sub> metabolites plasma levels ( $P = 0.008$ ). In the multiple linear regression analysis, these parameters remained significantly enhanced in CS after adding confounding factors. Results from association studies with cell type markers suggested that the increased mPGES-1/EP-4 levels were mainly associated with microvascular endothelial cells. **Conclusions.** This study shows that elements of the PGE<sub>2</sub> pathway, which play an important role in AAA development, are increased in CS. These results provide insight into the relevance of tobacco smoking in AAA development and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as targets for therapy in AAA patients.

## 1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) affects a high percentage of the aged population in industrialized countries and mortality rates associated with rupture of AAA are high. The aetiology of AAA is essentially unknown, but it is generally accepted that environmental and genetic factors contribute substantially to the risk of AAA [1]. An association between AAA and atherosclerosis has long been recognized. There are, however, histological and epidemiologic differences between the two diseases. The major risk factors for AAA are increasing age, family history,

male gender, hyperlipidemia (HL), arterial hypertension (HTN), and smoking [1]. Of these, smoking seems to be the most relevant, with a considerably higher risk for AAA than for atherosclerosis [2]. Diabetes mellitus (DM) is a well-established risk factor for atherosclerosis and has been reported to be protective for AAA [3]. Studying the influence of cardiovascular risk factors, particularly those that differentially influence AAA and atherosclerosis, could help to ascertain the causes of AAA.

Human AAA is characterized by leukocyte infiltration into adventitia and media and depletion of vascular smooth



muscle cells (VSMC) in the media. Another relevant feature of the disorder is a decrease in AAA wall strength caused by the breakdown of elastic fibres and the hypervascularization of aortic tissue [4]. A key factor in the pathophysiology of AAA is PGE<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> induces expression of metalloproteinases and inhibits the production of macromolecules of the extracellular matrix [5, 6]. It acts as a signalling molecule in response to proangiogenic factors and also induces release of several angiogenic factors in a manner of positive loop [7–10]. Consequently, inhibition or deletion of the enzymes involved in the biosynthetic pathway of PGE<sub>2</sub> interferes in AAA development in animal models [11–15].

PGE<sub>2</sub> biosynthesis begins with the formation of PGH<sub>2</sub> from arachidonic acid (AAc) catalyzed by cyclooxygenase (COX). PGH<sub>2</sub> is in turn isomerized to PGE<sub>2</sub> by PGE-synthases (PGES) [16]. The microsomal isoform of PGES, mPGES-1, is inducible by proinflammatory cytokines and it seems to be the essential PGES isoenzyme involved in PGE<sub>2</sub> biosynthesis under inflammatory conditions [17–19]. COX-2/mPGES-1 is widely regarded as the main contributing enzymatic tandem for PGE<sub>2</sub> biosynthesis under pathological conditions.

PGE<sub>2</sub> exerts its cellular effects by binding to four distinct E-prostanoid receptors (EP1–4). EPs belong to the family of seven transmembrane G protein-coupled rhodopsin-type receptors. Each receptor has different and often opposing biological effects. EP2 and EP4 are G<sub>s</sub> proteins-coupled receptors and they upregulate intracellular cAMP levels. EP3 usually counteracts EP2- and EP4-mediated upregulation of cAMP by preferentially coupling to G<sub>i</sub> proteins [20]. Also, interventions on the PGE<sub>2</sub> receptor display benefits in experimental AAA [21, 22].

We recently reported that COX-2, mPGES-1, EP-2, and EP-4 are upregulated in AAA and that the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis could play a relevant role in AAA-associated hypervascularization from the early stages of AAA development [23]. However, information is lacking regarding the influence of cardiovascular risk factors on local levels of the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in AAA.

In this study, we aimed to evaluate the influence of major cardiovascular risk factors on the PGE<sub>2</sub> pathway in human abdominal aortic aneurysms.

## 2. Methods

**2.1. Patients.** The inclusion criteria for this study were patients who underwent open repair for AAA with an atherosclerotic aneurysm and in whom an infrarenal aorta biopsy was taken during the intervention. The exclusion criteria were absence or inadequate aortic biopsy, pseudoaneurysms, and infectious or inflammatory aneurysms. All patients underwent surgery at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP). The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each patient. All procedures were reviewed by the institutional review board at HSCSP. The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

**2.2. Tissue Samples.** Samples were obtained from remaining midinfrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic replacement of AAA. When luminal thrombus was present it was separated before the aorta biopsy was taken and aortic tissue was washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS). A portion of each sample was placed in RNeasy lysis solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C for 24 hours before long-term storage at –80°C until further processing for RNA isolation. When possible a portion was fixed in formalin solution 10% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) for 24 h and included in paraffin for immunohistochemical studies.

**2.3. Risk Factors Definitions.** The risk factors definitions used in this study were diabetes mellitus (DM): glycated haemoglobin >5.8% or use of oral antidiabetic drugs or insulin; arterial hypertension (HTN): systolic blood pressure ≥140 mmHg, diastolic blood pressure ≥80 mmHg, or use of antihypertensive medication; hyperlipidemia (HL): a total cholesterol >6.2 mmol/L, LDL cholesterol >1.70 mmol/L, or triglycerides >1.65 mmol/L; smoking: categorized into 2 groups: current smoking (CS): smokers and ex-smokers who stopped smoking <1 year and noncurrent smoking (N-CS): never-smokers and ex-smokers who stopped smoking >1 year; chronic obstructive pulmonary disease (COPD): FEV1/FVC < 0.7; and renal insufficiency (RI): estimated glomerular filtration rate (eGFR) ≤60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [24].

**2.4. Analysis of mRNA Levels in the Tissues and Culture Cells.** Tissues were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcription of 1 μg RNA using High-Capacity cDNA Archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA expression of the selected genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT using predesigned validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/β-actin ratios.

**2.5. Plasma Levels of PGE<sub>2</sub>.** A sample of 10 mL of peripheral blood was collected in heparin-containing tubes. Blood was collected before anesthesia in the operating room. It was centrifuged immediately and plasma aliquoted and frozen at –80°C until analysis. PGE<sub>2</sub> and 13,14-dihydro-15-oxo-PGE<sub>2</sub> were determined using enzyme immunoassay (EIA) kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions.

**2.6. Immunohistochemistry.** Immunohistochemical studies were performed using a rabbit polyclonal antibody against mPGES-1 (ref. HPA045064 prestige antibodies, diluted 1 : 50) from Sigma and a mouse monoclonal antibody anti-EP-4 (ref. 101775, diluted 1:100) from Cayman Chemical.

Blanks were performed using the corresponding blocking peptides all from Cayman. Monoclonal antibodies (ref. M0616, diluted 1:35; ref. IR751 and ref. IR613, without further dilution) from Dako were used for von Willebrand Factor (vWF, endothelial cell marker), CD45 (pan-leukocyte marker), and CD68 immunostaining. Three-micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex kit. Diaminobenzidine was used as chromogen. Immunostainings used for comparative purposes were processed simultaneously.

**2.7. Statistical Analysis.** SPSS and Sigma-Stat software were used for statistical analysis. All data regarding transcript levels are expressed relative to  $\beta$ -actin  $\times 1000$ . All quantitative data in this study were nonnormally distributed and expressed as median (25th–75th percentile). We used the Mann-Whitney rank sum test to compare the two groups. The Pearson product moment correlation was used to evaluate the association between continuous variables after Log10 transformation of data with nonnormal distribution. Data were also analyzed using a multiple linear model including the effect of the identified risk factors and controlling possible confounding factors; a logarithmic transformation was applied to those outcomes without a normal distribution. A *P* value below 0.05 was considered significant.

### 3. Results

From 2008 to 2012, 225 elective AAA were performed in our center (Department of Vascular and Endovascular Surgery of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, Spain). 166 patients underwent open surgery and 59 had endovascular aortic repair (EVAR). An adequate biopsy was obtained from 89 patients during the intervention.

Table 1 shows the number and characteristics of participants. None of the risk factors caused significant differences in either COX-1 or COX-2 levels between AAA samples (Table 2). Regarding mPGES-1, only current smoking (CS) showed significant high transcript levels when compared with the noncurrent smokers (N-CS) group. mPGES-1 expression was higher in patients suffering COPD than in those without COPD, but the difference did not reach statistical significance. Next we evaluated the association between risk factors. Following  $\chi^2$  analysis, we identified COPD and HTN as variables likely related to CS. As these two variables could act as confounding factors (Table 3), we applied multiple linear regression analysis. The relationship between CS and mPGES-1 remained stable even in the presence of the confounding factors (COPD and HTN) in the statistics ( $P = 0.03$ ). We found that plasma levels of PGE<sub>2</sub> in AAA patients were significantly enhanced in the CS group when compared with the N-CS group (Table 4). None of the other risk factors analysed had statistically significant differences regarding circulating levels of PGE<sub>2</sub>. When confounding variables were taken into account, multiple linear regression analysis showed statistically significant differences between CS and N-CS groups ( $P = 0.012$ ).

TABLE 1: Clinical characteristics of individuals with AAA included in the study, demographics, and risk factors.

Measurements characteristic	mRNA	Plasma levels
Number	89	79
Aortic diameter (mm)	66 $\pm$ 12.7	64.3 $\pm$ 11.6
Age (years)	71.1 $\pm$ 6.5	72.4 $\pm$ 6.8
Male	87 (97.8%)	75 (94.9%)
Diabetes mellitus	19 (21.3%)	21 (26.6%)
Hypertension	63 (70.8%)	60 (75.9%)
Hyperlipidemia	54 (60.7%)	51 (64.6%)
Smoking habits		
Noncurrent smokers	63 (70.8%)	60 (75.9%)
Current smokers	26 (29.2%)	19 (24.1%)
Coronary artery disease (CAD)	20 (22.4%)	22 (27.9%)
Angor pectoris	2 (2.2%)	4 (5.1%)
Myocardial infarction	6 (6.7%)	6 (7.6%)
Coronary intervention/CABG	12 (13.5%)	12 (15.2%)
Chronic renal insufficiency	34 (38.2%)	23 (29.1%)
Dialysis	0	0
Peripheral vascular disease	48 (53.9%)	45 (57%)
Absence pulses	31 (34.8%)	30 (38%)
Intermittent claudication	17 (19.1%)	15 (19%)
Cerebrovascular disease	7 (7.9%)	7 (8.8%)
Cerebral vascular attack	4 (4.5%)	5 (6.3%)
Transient ischemic attack	3 (3.4%)	2 (2.5%)
COPD	26 (29.2%)	17 (21.5%)
Antiplatelet users	47 (53.4%)	48 (61.5%)
Statins users	57 (64%)	58 (73.4%)
ACEIs users	23 (20.7%)	24 (30.8%)
NSAD users	6 (6.7%)	3 (3.8%)
Corticoid users	6 (6.7%)	4 (5.1%)
Immunosuppressors	4 (3.5%)	2 (2.5%)

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean  $\pm$  SD. Aortic diameter: aneurysm maximum transverse diameter in mm; chronic renal insufficiency: estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>; noncurrent smokers: never smokers or quit smoking  $>1$  year; CABG: coronary artery bypass grafting; COPD: chronic occlusive pulmonary disease.

Figure 1(a) shows examples of leukocyte infiltration of AAA samples. Microvessels were abundant in the adventitia and in the media. While major infiltrated leukocytes (determined by CD45 immunostaining) systematically accumulated in perivascular areas of microvessels, macrophages (determined by CD68 immunostaining) displayed a more scattered pattern. Immunohistochemistry study of mPGES-1 was performed in AAA samples from 4 patients of each smoking group to localize the protein expression. No differences were observed between CS and N-CS groups regarding mPGES-1 protein location. mPGES-1 was located in MVEC, VSMC, and infiltrating leukocytes (Figure 2(a)). In an attempt to approach the origin of the differences of mPGES-1

TABLE 2: Transcript levels of COX isoenzymes and mPGES-1 in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table 1. Data are expressed as relative to  $\beta$ -actin x1000.

	Median	25th–75th percentile	<i>P</i> value versus no-factor <sup>a</sup>
COX-1			
No current smoking	10.7	7.68–14.3	
Current smoking	11.6	9.47–18.7	0.109
No renal insufficiency	10.9	8.50–16.3	
Renal insufficiency	10.7	7.78–15.8	0.896
No hypertension	10.8	9.62–16.1	
Hypertension	10.7	7.49–15.8	0.419
No diabetes mellitus	11.0	8.67–15.9	
Diabetes mellitus	9.71	6.48–15.1	0.365
No hyperlipidemia	12.3	8.20–16.1	
Hyperlipidemia	10.6	8.39–14.3	0.457
No COPD <sup>b</sup>	11.0	8.45–15.9	
COPD	10.4	8.07–15.3	0.695
COX-2			
No current smoking	10.1	4.68–15.8	
Current smoking	10.3	5.34–17.6	0.604
No renal insufficiency	9.27	5.25–18.7	
Renal insufficiency	10.9	5.30–14.6	0.678
No hypertension	8.57	5.09–16.7	
Hypertension	10.4	5.70–16.0	0.695
No diabetes mellitus	9.27	4.70–15.9	
Diabetes mellitus	11.6	6.90–24.7	0.188
No hyperlipidemia	9.28	5.36–16.5	
Hyperlipidemia	10.6	5.09–15.8	0.990
No COPD <sup>b</sup>	10.1	5.20–16.5	
COPD	10.6	5.60–15.0	0.889
mPGES-1			
No current smoking	2.42	1.16–4.08	
Current smoking	3.46	2.33–4.95	0.009
No renal insufficiency	2.69	1.24–3.82	
Renal insufficiency	2.69	1.90–4.67	0.245
No hypertension	2.87	1.74–3.67	
Hypertension	2.66	1.48–4.46	0.735
No diabetes mellitus	2.78	1.50–4.26	
Diabetes mellitus	2.47	1.20–4.36	0.606
No hyperlipidemia	2.66	2.06–3.65	
Hyperlipidemia	2.76	1.20–4.51	0.798
No COPD <sup>b</sup>	2.39	1.16–4.09	
COPD	2.90	2.35–4.75	0.06

<sup>a</sup>Mann-Whitney Rank Sum Test.

<sup>b</sup>Chronic obstructive pulmonary disease.

in our AAA samples, we determined the statistical association of mPGES-1 transcript levels with cell-characteristic markers as independent variables. We analysed mRNA levels of von Willebrand Factor (vWF),  $\alpha$ -actin, and CD68 as markers of endothelial cell, VSMC, and macrophages, respectively. No significant statistical association was found between mPGES-1 and CD68 transcript levels (not shown). In contrast, mPGES-1 levels significantly correlated with both  $\alpha$ -actin and vWF (Figure 2(b)). We then explored the influence of CS on

the cell markers and no significant differences were found between CS and N-CS (not shown).

Regarding PGE<sub>2</sub> receptors, EP-1 was expressed only scarcely in AAA samples and therefore was not considered for the analysis of cardiovascular risk factors. No risk factor caused statistically significant variation of either EP-2 or EP-3. In contrast, significant differences between CS and N-CS groups were found regarding EP-4, CS having the highest transcript levels when simple statistical analysis was applied

TABLE 3:  $\chi^2$  analysis of risk factors.

Variable	COPD	CS	DM	HL	RI
HTN	$\chi^2 = 1.494$ $P = 0.222$	$\chi^2 = 3.371$ $P = 0.066$	$\chi^2 = 1.801$ $P = 0.180$	$\chi^2 = 0.0318$ $P = 0.859$	$\chi^2 = 4.448$ $P = 0.035$
COPD		$\chi^2 = 8.464$ $P = 0.004$	$\chi^2 = 0.0006$ $P = 0.981$	$\chi^2 = 0.082$ $P = 0.775$	$\chi^2 = 9.952$ $P = 0.002$
CS			$\chi^2 = 0.0326$ $P = 0.857$	$\chi^2 = 0.0009$ $P = 0.976$	$\chi^2 = 1.223$ $P = 0.269$
DM				$\chi^2 = 2.55$ $P = 0.110$	$\chi^2 = 0.04$ $P = 0.842$
HL					$\chi^2 = 0.003$ $P = 0.957$

HTN: arterial hypertension; COPD: chronic occlusive pulmonary disease; CS: current smoking; DM: diabetes mellitus; HL: hyperlipidemia; RI: renal insufficiency.

TABLE 4: Plasma levels of PGE<sub>2</sub> in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table 1. Plasma levels of PGE<sub>2</sub> are expressed as pg/mL.

	Median	25th–75th percentile	<i>P</i> value versus no-factor <sup>a</sup>
Plasma-PGE <sub>2</sub>			
No current smoking	55.9	39.3–71.1	
Current smoking	68.0	57.1–119.5	0.008
No renal insufficiency	58.4	44.0–71.4	
Renal insufficiency	59.4	39.3–104.3	0.786
No hypertension	70.1	53.0–95.2	
Hypertension	56.2	39.4–77.2	0.140
No diabetes mellitus	56.5	38.6–94.9	
Diabetes mellitus	60.7	55.8–68.8	0.294
No hyperlipidemia	55.8	44.5–101.9	
Hyperlipidemia	60.7	41.2–72.0	0.947
No COPD <sup>b</sup>	59.4	43.3–74.3	
COPD	57.1	43.5–115.9	0.807

<sup>a</sup>Mann-Whitney rank sum test.

<sup>b</sup>Chronic occlusive pulmonary disease.

(Table 5). Moreover, when confounding variables (COPD and HTN) were introduced in statistics the relationship between CS and EP-4 remained stable ( $P = 0.007$ ). EP-4 was almost undetectable in VSMC in culture in terms of mRNA (78-fold lower than in MVEC, not shown). Immunohistochemical staining indicated that EP-4 was much less expressed in VSMC than in MVEC. EP-4 was detected mainly in MVEC and infiltrating leucocytes. No differences between CS and N-CS groups were observed regarding localization of EP-4 (Figure 3(a)). The association between EP-4 and CD68 transcript levels was poor (Figure 3(b)), whereas the association with vWF was stronger. In addition, we observed an excellent correlation between mPGES-1 and EP-4 transcript levels.

#### 4. Discussion

This is the first study to describe the influence of cardiovascular risk factors on local levels of PGE<sub>2</sub> pathway in abdominal aortic aneurysm. We found that current smoking

was associated with increased local expression of transcript levels of mPGES-1 in AAA.

In accordance with other reports, we recently found that local expression of COX-2 was increased in aneurysmal tissue. Additionally, we reported that mPGES-1 was increased in AAA and that the upregulation of COX-2/mPGES-1 precedes maximal leukocyte infiltration [23]. We found that EP-2 and EP-4 were upregulated in AAA, whereas EP-3 was significantly downregulated. An interesting finding was that PGE<sub>2</sub>-mediated in vitro angiogenesis was fully dependent on EP-4. Herein, we report the influence of the most relevant cardiovascular risk factors on the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis expression.

Current smoking was the only cardiovascular risk factor that was significantly associated with increased local expression of mPGES-1 in aneurysmal aorta. However, it had no effect on COX-2 expression. This observation is consistent with the fact that COX-2 and mPGES-1 display different regulation in vitro [18, 19]. The increase in the expression of PGE<sub>2</sub> biosynthetic machinery was consistent

TABLE 5: Transcript levels of PGE receptors in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table 1. Data are expressed as relative to  $\beta$ -actin x1000.

	Median	25th–75th percentile	<i>P</i> value versus no-factor <sup>a</sup>
EP-2			
No current smoking	3.98	2.53–8.63	
Current smoking	4.84	2.42–7.46	0.811
No renal insufficiency	3.98	2.66–9.05	
Renal insufficiency	4.49	2.41–7.72	0.653
No hypertension	4.58	2.42–8.22	
Hypertension	4.10	2.56–8.41	0.946
No diabetes mellitus	3.98	2.45–7.24	
Diabetes mellitus	5.27	2.88–23.6	0.115
No hyperlipidemia	3.91	2.38–6.60	
Hyperlipidemia	5.31	2.82–12.0	0.068
No COPD <sup>b</sup>	3.98	2.51–9.82	
COPD	4.95	2.60–7.46	0.846
EP-3			
No current smoking	2.80	1.30–6.18	
Current smoking	3.41	2.16–6.32	0.202
No renal insufficiency	2.68	1.47–4.74	
Renal insufficiency	3.36	1.94–8.02	0.172
No hypertension	3.12	1.98–5.74	
Hypertension	3.06	1.45–6.30	0.484
No diabetes mellitus	3.18	1.87–5.67	
Diabetes mellitus	1.94	0.64–10.4	0.305
No hyperlipidemia	3.47	1.82–7.19	
Hyperlipidemia	2.54	1.46–5.32	0.288
No COPD <sup>b</sup>	3.16	1.49–6.05	
COPD	2.95	1.92–6.21	0.853
EP-4			
No current smoking	4.29	3.24–6.49	
Current smoking	5.93	4.87–8.92	0.007
No renal insufficiency	4.63	3.47–6.25	
Renal insufficiency	5.70	3.45–7.72	0.259
No hypertension	4.89	3.94–7.72	
Hypertension	4.93	3.45–6.61	0.394
No diabetes mellitus	4.92	3.48–6.66	
Diabetes mellitus	4.71	1.82–7.96	0.678
No hyperlipidemia	4.90	3.26–6.61	
Hyperlipidemia	4.91	3.51–7.32	0.678
No COPD <sup>b</sup>	4.90	3.52–6.57	
COPD	5.20	2.41–7.61	0.896

<sup>a</sup>Mann-Whitney rank sum test.

<sup>b</sup>Chronic obstructive pulmonary disease.

with the higher levels of PGE<sub>2</sub> observed in the plasma of the smoker patients. Nevertheless, as AAA should be considered a systemic disease of the vasculature [1], other vascular territories may contribute to circulating levels of PGE<sub>2</sub>.

The presence of mPGES-1 in a particular cell is necessary for PGE<sub>2</sub> biosynthesis [17–19, 25]. All vascular cells [17, 23, 26] and leukocytes [23], likely mainly macrophages, express mPGES-1. Our present results show that the expression levels of mPGES-1 correlate with the expression of vascular cell

markers rather than with infiltrating macrophages markers suggesting that mPGES-1 is expressed in VSMC and MVEC as we reported before [17, 18, 26]. Therefore, changes in the number of VSMC and MVEC influence mPGES-1 levels. The absence of statistically significant differences between the CS and N-CS groups regarding transcript levels of vascular cell markers, together with increased levels of mPGES-1 in the CS group, strongly suggests that expression of mPGES-1 is effectively upregulated in vascular cells in CS group.

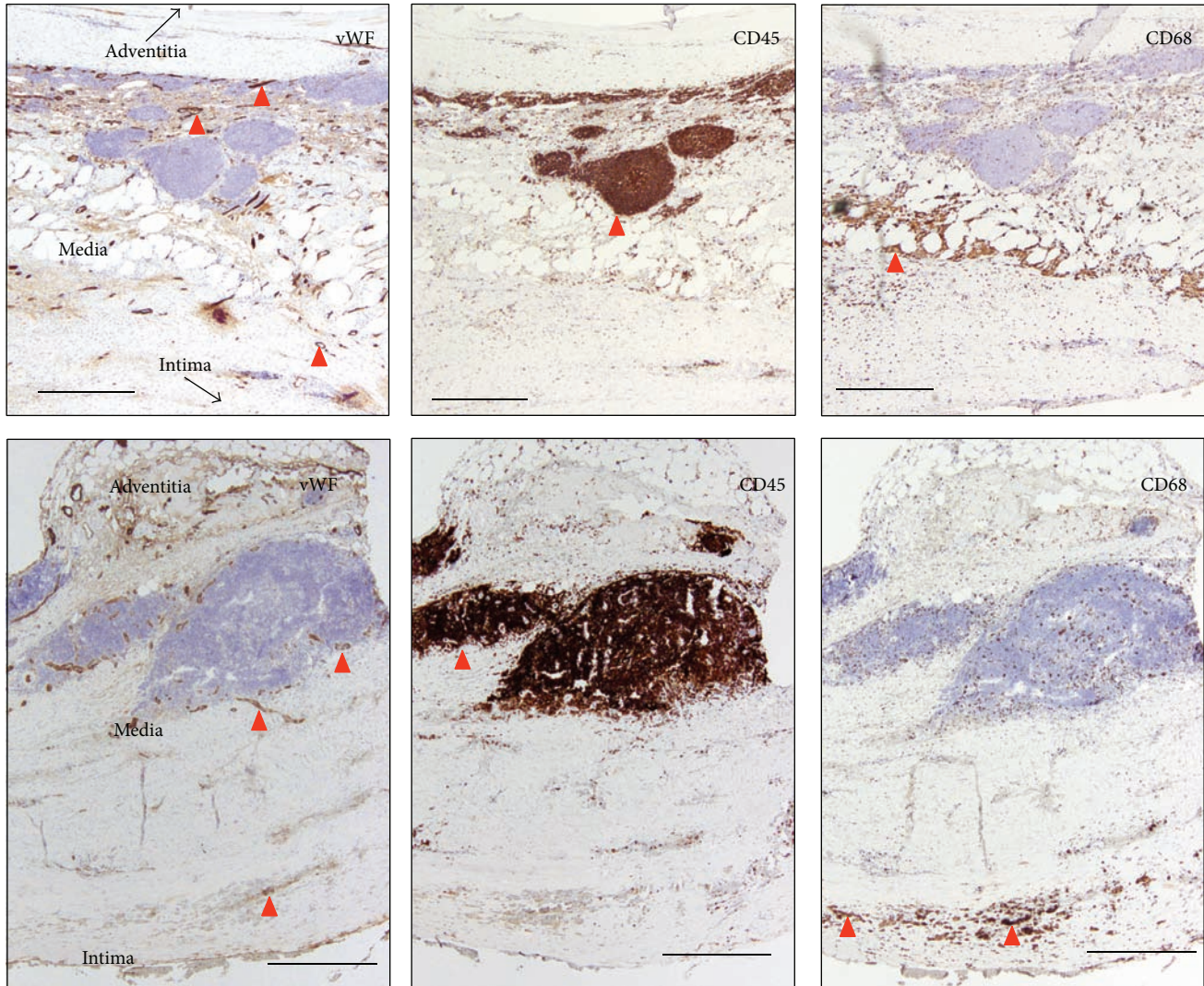


FIGURE 1: Representative immunohistochemical images of vWF (endothelial cell marker), CD45 (pan-leukocyte marker), and CD68 (macrophage marker) in aorta samples from two AAA patients. Red arrow-heads indicate some immunostained cells. Size bars: 500  $\mu\text{m}$ . In upper panels black-tipped arrows are used to orient the position of the vessel by indicating to where intima and adventitia are.

Nevertheless, VSMC tends to be reduced whereas MVEC are substantially increased in AAA [1, 4, 26]. Altogether, our results heighten the role that MVEC-associated mPGES-1 and current smoking could have in AAA progression. Of course this does not rule out the important role of macrophages in AAA progression. Indeed, macrophage COX-2-derived PGE<sub>2</sub> has been found to be relevant in the pathogenesis and rupture of AAA [12, 27, 28].

Regarding PGE<sub>2</sub> receptors, only CS had an effect on the local levels of EP-4. Active smokers had significantly higher levels of EP-4 transcript. EP-4 is the most abundant subtype of PGE<sub>2</sub> receptor in endothelial cells and it is a key receptor for PGE<sub>2</sub>-induced angiogenesis [23]. It was expressed in leukocytes, but we found that variation of EP-4 expression correlated better with vWF mRNA levels (endothelial cell marker) than with CD68 (macrophage marker). The statistical significance of the difference between CS and N-CS regarding mPGES-1/EP-4 axis was maintained after

the introduction of HTN and COPD as confounding variables in the statistics. Moreover, the association of mPGES-1 and EP-4 transcript levels was highly significant. Taken together, our results support the concept that smoking substantially affects aortic vascular cells and suggest that MVEC are particularly affected.

Smoking is a particularly relevant risk factor for AAA [29]. It has been reported that the association between smoking and AAA is 2.5-fold higher than the association between smoking and coronary heart disease [2]. Tobacco smoke also enhances AAA formation in animal models [30, 31]. Our data indicated that mPGES-1/EP-4 is mainly linked to vascular cell state, whereas local levels of COX-2 depend on several factors such as the inflammatory infiltrate in the aortic wall. Local levels of COX-2 were not associated with any particular marker. Therefore, it seems that smoking affects the state of the vascular cells more than the degree of leukocyte infiltration. Many reports provide evidence supporting the

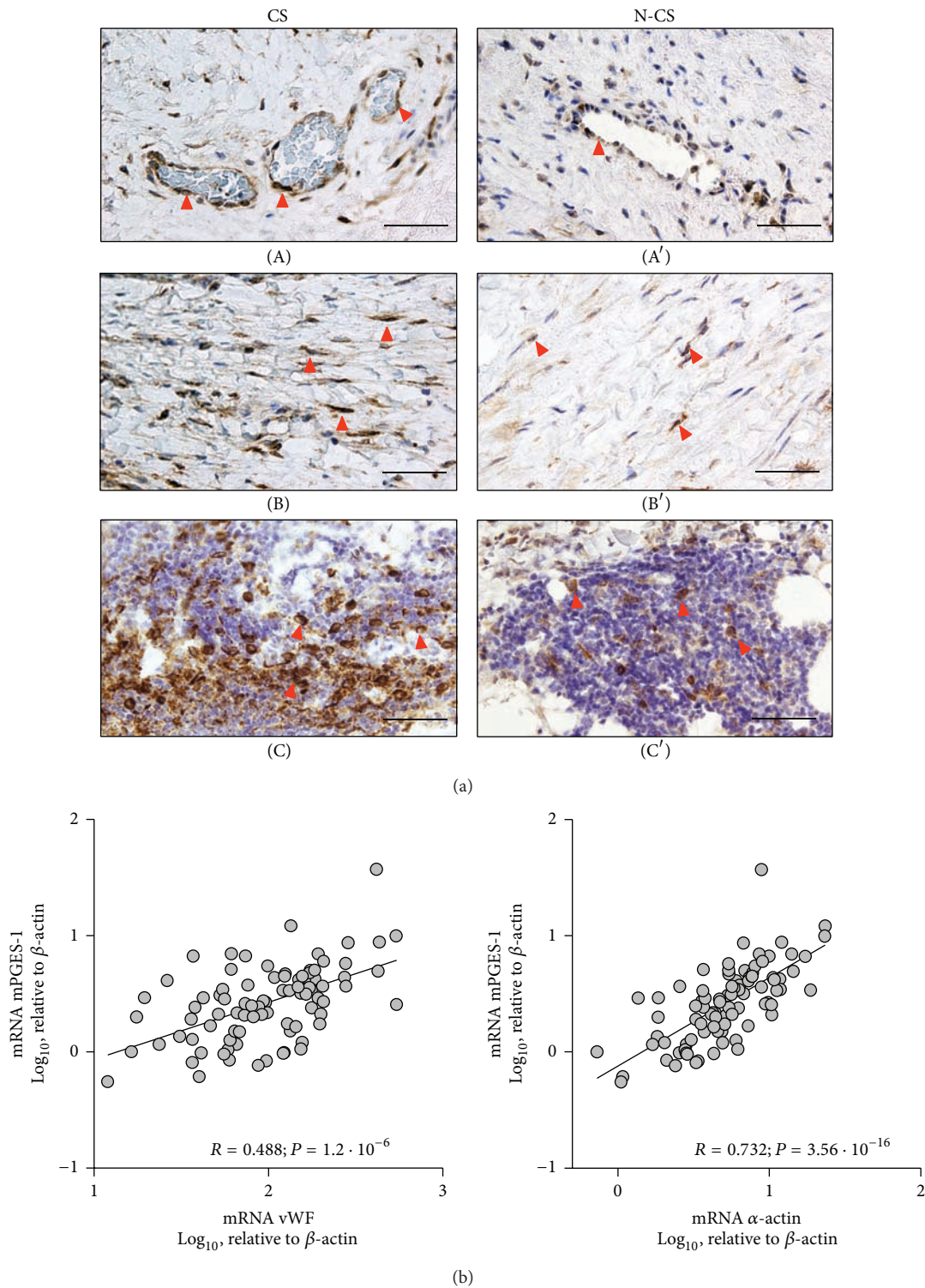


FIGURE 2: (a) Representative immunohistochemical images of mPGES-1 in aorta samples from current smokers (CS, left) and noncurrent smokers (N-CS, right) patients, showing mPGES-1 immunostaining of MVEC (A, A'), VSMC of the media layer (B, B'), and mPGES-1 positive leukocytes (C, C'). Red arrow-heads indicate some immunostained cells. Size bars: 50 μm. (b) Correlation between mPGES-1 transcript levels and those of vascular cell markers; Pearson product moment correlation applied to log<sub>10</sub>-transformed data ( $n = 89$ ).

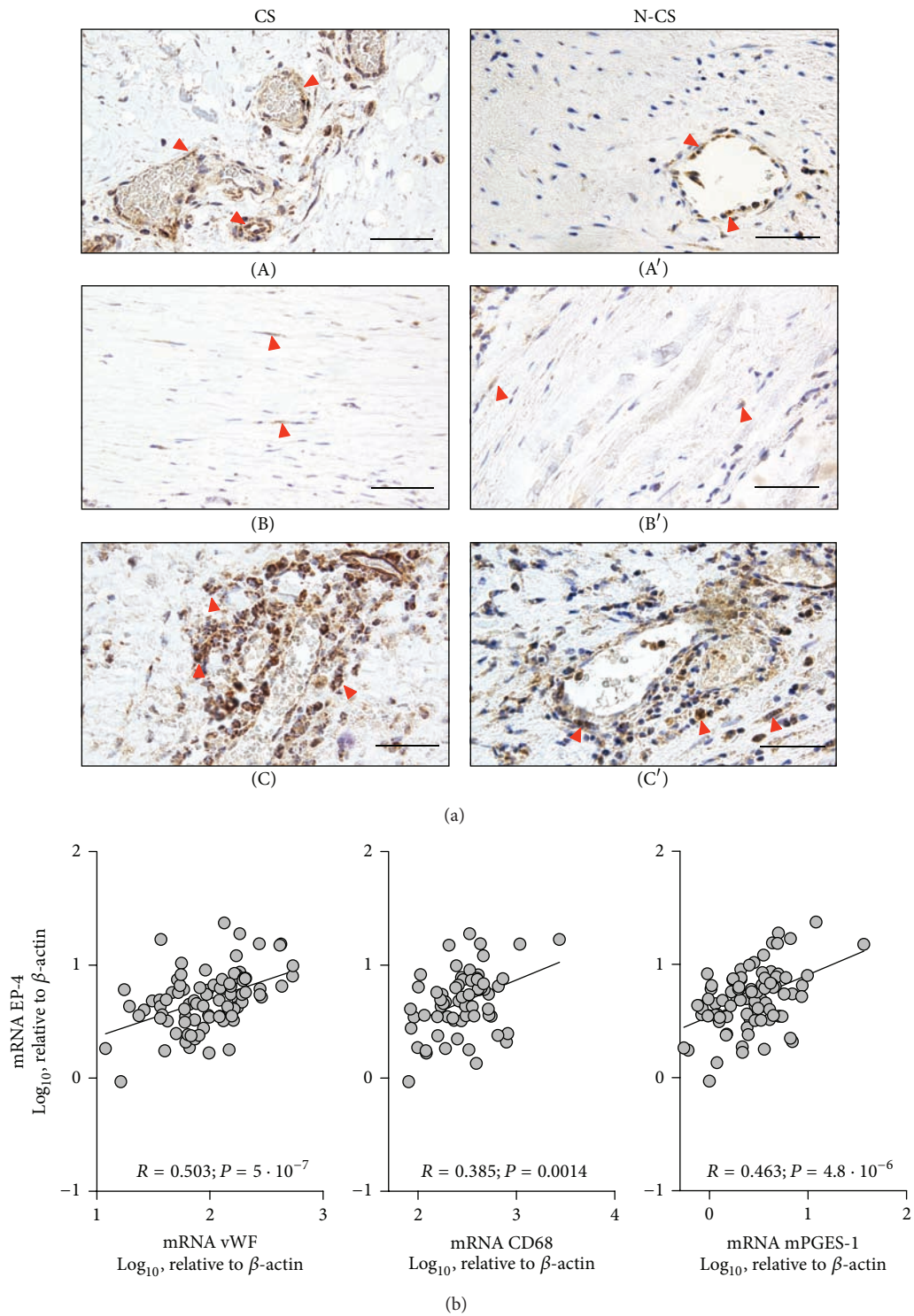


FIGURE 3: (a) Representative immunohistochemical images of EP-4 in aorta samples from current smokers (CS, left) and noncurrent smokers (N-CS, right) patients, showing EP-4 immunostaining of MVEC (A, A'), the scarce presence of EP-4 immunostaining in media layer in areas free of leucocyte infiltration (B, B'), and EP-4 positive leucocytes (C, C'). Red arrow-ends indicate some immunostained cells. Size bars:  $50 \mu\text{m}$ . (b) Correlation between mPGES-1 transcript levels and those of endothelial cell and macrophage markers and between EP-4 and mPGES-1; Pearson product moment correlation applied to  $\text{log}_{10}$ -transformed data ( $n = 89$ ).



association between renal function and atherosclerosis, and eGFR is an independent prognostic factor for cardiovascular disease [32]. We recently reported that eGFR is an excellent predictor of vascular events in patients with peripheral arterial disease [33]. Since RI could indicate the atherosclerosis level of patients, our results suggest that the effect of smoking on local levels of mPGES-1/EP-4 is independent of the atherosclerosis and COPD states of patients with AAA. These results support the lack of association of COPD and AAA with smoking described in a previous report [34]. More research is needed to ascertain the molecular species and signalling pathways involved in the effect of tobacco smoke on the induction of mPGES-1 and EP-4 expression in human AAA.

In conclusion, we show for the first time that current smoking increases MVEC-associated mPGES-1/EP-4 and provides further insight into the relevance of tobacco smoking in AAA development. Our data are consistent with reports showing that suppression of either mPGES-1 or EP-4 expression reduces AAA development in animal models [15, 21, 22] and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as alternative targets for therapy in AAA patients.

## Abbreviations

AAA: Abdominal aortic aneurysm  
 HTN: Arterial hypertension  
 COPD: Chronic occlusive pulmonary disease  
 CS: Current smoking  
 eGFR: Estimated glomerular filtration rate  
 HL: Hyperlipidemia  
 MVEC: Microvascular endothelial cells  
 RI: Renal insufficiency  
 VSMC: Vascular smooth muscle cells.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Authors' Contribution

Mercedes Camacho and Luis Vila contributed equally to this work.

## Acknowledgments

The authors thank Laura Sigüero, Sonia Alcolea, Montserrat Gómez, and Iris Rodríguez for their excellent technical support. This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Grant no. SAF2010/21392) and MINECO-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051).

## References

- [1] I. M. Nordon, R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson, "Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 8, no. 2, pp. 92–102, 2011.
- [2] F. A. Lederle, D. B. Nelson, and A. M. Joseph, "Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, no. 2, pp. 329–334, 2003.
- [3] S. Shantikumar, R. Ajjan, K. E. Porter, and D. J. A. Scott, "Diabetes and the abdominal aortic aneurysm," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 39, no. 2, pp. 200–207, 2010.
- [4] E. Choke, G. Cockerill, W. R. W. Wilson et al., "A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 30, no. 3, pp. 227–244, 2005.
- [5] M. L. Corcoran, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, and L. M. Wahl, "Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 1, pp. 515–519, 1992.
- [6] J. Varga, A. Diaz-Perez, J. Rosenbloom, and S. A. Jimenez, "PGE<sub>2</sub> causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 147, no. 3, pp. 1282–1288, 1987.
- [7] R. Salcedo, X. Zhang, H. A. Young et al., "Angiogenic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells," *Blood*, vol. 102, no. 6, pp. 1966–1977, 2003.
- [8] D. Wang, H. Wang, J. Brown et al., "CXCL1 induced by prostaglandin E<sub>2</sub> promotes angiogenesis in colorectal cancer," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 4, pp. 941–951, 2006.
- [9] T. Nakayama, N. Mutsuga, L. Yao, and G. Tosato, "Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, no. 1, pp. 95–104, 2006.
- [10] R.-Z. Qian, F. Yue, G.-P. Zhang, L.-K. Hou, X.-H. Wang, and H.-M. Jin, "Roles of cyclooxygenase-2 in microvascular endothelial cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor," *Chinese Medical Journal*, vol. 121, no. 24, pp. 2599–2603, 2008.
- [11] J. M. Gitlin, D. B. Trivedi, R. Langenbach, and C. D. Loftin, "Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice," *Cardiovascular Research*, vol. 73, no. 1, pp. 227–236, 2007.
- [12] L. J. Walton, I. J. Franklin, T. Bayston et al., "Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms," *Circulation*, vol. 100, no. 1, pp. 48–54, 1999.
- [13] T. Bayston, S. Ramessur, J. Reise, K. G. Jones, and J. T. Powell, "Prostaglandin E<sub>2</sub> receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, no. 2, pp. 354–359, 2003.
- [14] V. L. King, D. B. Trivedi, J. M. Gitlin, and C. D. Loftin, "Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 5, pp. 1137–1143, 2006.

- [15] M. Wang, E. Lee, W. Song et al., "Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation," *Circulation*, vol. 117, no. 10, pp. 1302–1309, 2008.
- [16] L. Vila, "Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis," *Medicinal Research Reviews*, vol. 24, no. 4, pp. 399–424, 2004.
- [17] M. Soler, M. Camacho, J.-R. Escudero, M. A. Iñiguez, and L. Vila, "Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase," *Circulation Research*, vol. 87, no. 6, pp. 504–507, 2000.
- [18] M. Camacho, E. Gerbolés, J.-R. Escudero, R. Antón, X. García-Moll, and L. Vila, "Microsomal prostaglandin E synthase-1, which is not coupled to a particular cyclooxygenase isoenzyme, is essential for prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, no. 7, pp. 1411–1419, 2007.
- [19] D. Solà-Vilà, M. Camacho, R. Solà, M. Soler, J.-M. Diaz, and L. Vila, "IL-1 $\beta$  induces VEGF, independently of PGE<sub>2</sub> induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells," *Kidney International*, vol. 70, no. 11, pp. 1935–1941, 2006.
- [20] S. Narumiya, Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, "Prostanoid receptors: structures, properties, and functions," *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 4, pp. 1193–1226, 1999.
- [21] R. Y. Cao, T. St Amand, X. Li et al., "Prostaglandin receptor EP4 in abdominal aortic aneurysms," *The American Journal of Pathology*, vol. 181, no. 1, pp. 313–321, 2012.
- [22] U. Yokoyama, R. Ishiwata, M.-H. Jin et al., "Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, Article ID e36724, 2012.
- [23] M. Camacho, J. Dilme, D. Solà-Vilà et al., "Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm," *Journal of Lipid Research*, vol. 54, pp. 3506–3515, 2013.
- [24] A. S. Levey, L. A. Stevens, C. H. Schmid et al., "A new equation to estimate glomerular filtration rate," *Annals of Internal Medicine*, vol. 150, no. 9, pp. 604–612, 2009.
- [25] M. Camacho, J. López-Belmonte, and L. Vila, "Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity," *Circulation Research*, vol. 83, no. 4, pp. 353–365, 1998.
- [26] K. Casós, L. Siguero, M. T. Fernández-Figueras et al., "Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation," *Microvascular Research*, vol. 81, no. 3, pp. 261–268, 2011.
- [27] K. S. Chapple, D. J. Parry, S. McKenzie, K. A. MacLennan, P. Jones, and D. J. A. Scott, "Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms," *Annals of Vascular Surgery*, vol. 21, no. 1, pp. 61–66, 2007.
- [28] B. L. Y. Cheuk and S. W. K. Cheng, "Differential secretion of prostaglandin E<sub>2</sub>, thromboxane A<sub>2</sub> and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 20, no. 3, pp. 391–395, 2007.
- [29] P. E. Norman and J. A. Curci, "Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 33, pp. 1473–1477, 2013.
- [30] C. Buckley, C. W. Wyble, M. Borhani et al., "Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure," *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 199, no. 6, pp. 896–903, 2004.
- [31] K. Stolle, A. Berges, M. Lietz, S. Lebrun, and T. Wallerath, "Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice," *Toxicology Letters*, vol. 199, no. 3, pp. 403–409, 2010.
- [32] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C.-Y. Hsu, "Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization," *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–1305, 2004.
- [33] J. M. Romero, J. Bover, J. Fite et al., "The Modification of Diet in Renal Disease 4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 56, no. 5, pp. 1324–1330, 2012.
- [34] C. A. Meijer, V. B. Kokje, R. B. van Tongeren et al., "An association between chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm beyond smoking: results from a case-control study," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 44, no. 2, pp. 153–157, 2012.



RESEARCH ARTICLE

# Expression and Cellular Localization of 15-Hydroxy-Prostaglandin-Dehydrogenase in Abdominal Aortic Aneurysm

David Solà-Vilà<sup>1</sup>, Jaime-Félix Dilmé<sup>2,3</sup>, Cristina Rodríguez<sup>4</sup>, Begoña Soto<sup>2,3</sup>, Luis Vila<sup>2</sup>, José-Román Escudero<sup>2,3</sup>, José Martínez-González<sup>4</sup>, Mercedes Camacho<sup>2\*</sup>

**1** Autonomous University of Barcelona, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain, **2** Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain, **3** Vascular Surgery Department, Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain, **4** Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC), Institute of Biomedical Research (II-B Sant Pau), Barcelona, Spain

\* [mcamacho@santpau.cat](mailto:mcamacho@santpau.cat)



CrossMark  
click for updates

OPEN ACCESS

**Citation:** Solà-Vilà D, Dilmé J-F, Rodríguez C, Soto B, Vila L, Escudero J-R, et al. (2015) Expression and Cellular Localization of 15-Hydroxy-Prostaglandin-Dehydrogenase in Abdominal Aortic Aneurysm. PLoS ONE 10(8): e0136201. doi:10.1371/journal.pone.0136201

**Editor:** Michael Bader, Max-Delbrück Center for Molecular Medicine (MDC), GERMANY

**Received:** May 4, 2015

**Accepted:** July 30, 2015

**Published:** August 19, 2015

**Copyright:** © 2015 Solà-Vilà et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by grants SAF2010-21392 (LV), SAF2013-46707-R (LV, MC), SAF2012-40127 (JM-G) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, PI12/01952 (CR) and Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051 (LV) and RD12/0042/0053 (JM-G) from the Instituto de Salud Carlos III. The study was cofunded by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a way to make Europe. The funders had no role in

## Abstract

PGE<sub>2</sub> has been implicated in abdominal aortic aneurysm (AAA) associated hypervascularization. PGE<sub>2</sub>-metabolism involves 15-hydroxyprostaglandin-dehydrogenase (15-PGDH) the expression of which in AAA is unknown. The aim of this study was to examine the expression and cell distribution of 15-PGDH in AAA. Here, we show that 15-PGDH mRNA levels were significantly higher in aorta samples from patients undergoing AAA repair than in those from healthy multiorgan donors. Consequently, the ratio of metabolized PGE<sub>2</sub> secreted by aortic samples was significantly higher in AAA. AAA production of total PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> metabolites correlated positively with PGI<sub>2</sub> production, while the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> correlated negatively with the total amount of PGE<sub>2</sub> and with PGI<sub>2</sub>. Transcript levels of 15-PGDH were statistically associated with leukocyte markers but did not correlate with microvascular endothelial cell markers. Immunohistochemistry revealed 15-PGDH in the areas of leukocyte infiltration in AAA samples, mainly associated with CD45-positive cells, but not in normal aorta samples. We provide new data concerning 15-PGDH expression in human AAA, showing that 15-PGDH is upregulated in AAA and mainly expressed in infiltrating leukocytes. Our data suggest that microvasculature was not involved in PGE<sub>2</sub> catabolism, reinforcing the potential role of microvasculature derived PGE<sub>2</sub> in AAA-associated hypervascularization.

## Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a vascular degenerative disease with high morbidity and mortality in the aged population in industrialized countries and mortality rates associated with rupture of AAA are high [1]. AAA formation and rupture are closely accompanied by inflammation and neovascularization of the media layer both contributing to the progressive

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

weakening and dilation of the vascular wall [2]. Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> a prevalent inflammatory mediator in many tissues and inflammatory diseases has been involved in angiogenic processes in cancer and other pathologies.

Animal models and human studies indicate that PGE<sub>2</sub> is involved in the pathogenesis of AAA [3–5]. PGE<sub>2</sub> binds to four distinct E-prostanoid receptors (EP1–4) that belong to the family of seven transmembrane G protein-coupled receptors [6]. Biosynthesis of PGE<sub>2</sub> begins with the release of arachidonic acid by phospholipases from the membrane phosphoglycerides, which is in turn oxidized to PGH<sub>2</sub> by the action of cyclooxygenase (COX) [7,8]. PGH<sub>2</sub> isomerizes to PGE<sub>2</sub> by PGE-synthases (PGES). The microsomal isoform of PGES (mPGES-1) is inducible by proinflammatory cytokines and seems to be the main isoenzyme involved in PGE<sub>2</sub> biosynthesis under inflammatory conditions [9–12]. COX-2/mPGES-1 is widely regarded as the major contributing enzymatic chain for PGE<sub>2</sub> biosynthesis under pathological conditions.

Despite the relevance of angiogenesis in AAA, information concerning COX-2/mPGES-1 derived PGE<sub>2</sub> in the AAA-associated hypervascularization is limited and restricted to leukocytes COX-2-derived PGE<sub>2</sub> [3,13–15]. We recently reported data supporting the role of microvascular endothelial cells (MVEC) COX-2/mPGES-1/EP-4 axis on the AAA associated hypervascularization [16]. We confirmed previous reports showing that COX-2 is upregulated in AAA and we found that mPGES-1 expression was also increased in AAA [16]. Both COX-2 and mPGES-1 have been found to be expressed in MVEC, VSMC and infiltrating leukocytes in AAA [10,11,16,17]. Nevertheless, the relative contribution of vascular cells *versus* infiltrating leukocytes to the pool of active PGE<sub>2</sub> in AAA remains unclear. Regarding PGE<sub>2</sub>-mediated angiogenesis, the relative cell contribution to the active pool of this PG and the expression profile of PGE-receptors is relevant to understand the role of MVEC in AAA development.

Levels of PGE<sub>2</sub> are regulated by its biosynthesis to degradation ratio. The first enzyme involved in PG catabolism is NAD<sup>+</sup>-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH). PGs are rapidly metabolized by the initial oxidation of the 15(S)-hydroxyl group catalyzed by 15-PGDH followed by the reduction of the 13,14-double bond generating 13,14-dihydro-15-oxo-prostaglandins [18]. This enzyme has therefore been considered key to the biological inactivation of prostaglandins. 15-PGDH is widely distributed in various mammalian tissues, lung being one of the most active [19], and it has been viewed as a tumor suppressor in the field of cancer [20,21]. Nevertheless, its role in cardiovascular diseases, particularly in AAA, is unknown. The present study was undertaken to compare 15-PGDH expression in samples of aorta from AAA patients and healthy donors and to determine its cellular localization.

## Materials and Methods

### Patients

The study was approved by the Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Santa Creu i Sant Pau, approval number 10/009/1048. Written informed consent was obtained from each patient. The study conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. The inclusion criteria for this study were patients who underwent open repair for AAA with an atherosclerotic aneurysm and in whom an infrarenal aorta biopsy was taken during the intervention. The exclusion criteria were inadequate or no aortic biopsy, pseudoaneurysms, and infectious or inflammatory aneurysms. All patients underwent surgery at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP).

### Tissue samples

Samples were obtained from the remaining mid-infrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic replacement of AAA. Normal aortas (NA) were obtained from healthy aorta from

multiorgan donors and samples were also taken from the mid-portion of the infrarenal abdominal aorta at organ harvest. When a luminal thrombus was present it was separated before the aorta biopsy was taken and aortic tissue was washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS). A portion of each sample was placed in RNeasy lysis solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C for 24 hours before long-term storage at -80°C until further processing for RNA isolation. When possible a portion was fixed in formalin solution 10% (Sigma-Aldrich, Inc St Louis, MO) for 24 h and included in paraffin for immunohistochemical studies.

### Clinical data definitions

Risk factor definitions used in this study were: diabetes mellitus: glycated haemoglobin >5.8% or use of oral antidiabetic drugs or insulin; arterial hypertension: systolic blood pressure  $\geq 140$  mm Hg, diastolic blood pressure  $\geq 80$  mm Hg or use of antihypertensive medication; hyperlipidemia: a total cholesterol >6.2 mmol/L, LDL cholesterol >1.70 mmol/L or triglycerides >1.65 mmol/L; smokers: current smokers and ex-smokers stopped smoking <1 year; chronic obstructive pulmonary disease (COPD): FEV1/FVC <0.7; and renal insufficiency: estimated glomerular filtration rate (eGFR)  $\leq 60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [22].

### Microvascular endothelial cells (MVEC) culture

MVEC were isolated from human adult foreskins using a previously described technique [17,23]. In brief, foreskins obtained from adult circumcisions were placed in PBS supplemented with penicillin 200 units/mL, streptomycin 200 µg/mL and amphotericin B 0.5 µg/mL (all from Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). Foreskins were cut into 3 mm squares and placed in PBS containing 0.3% trypsin and 1% EDTA at 37°C for 30 minutes. Segments were then washed several times with PBS, placed in a Petri dish in M199 containing 10% foetal bovine serum (FBS), and individually compressed with the side of a scalpel blade to express microvascular fragments. The microvascular segments were passed through a 150 µm stainless steel mesh and collected by centrifugation at 300xg for 15 minutes. MVEC were seeded on a gelatin-coated cell culture flask and cultured in medium MCDB131 with 20% FBS; L-glutamine 2 mmol/L, penicillin 200 units/mL, streptomycin 200 µg/mL, EGF 20 ng/mL and bFGF 5 ng/mL (all from Biological Industries). When cells reached confluence, they were purified with Dynabeads CD31 (Dynabeads, Invitrogen Dynal ASA, Oslo, Norway) following the manufacturer's instructions. Flow cytometry and positive staining for CD31, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) confirmed the purity of the cell population. MVEC were used in passage 3.

### Aortic VSMC culture

Aortic human VSMC cultures were established by an explant procedure from multi-organ donor aortas as previously described [10,11]. The artery was longitudinally split and the endothelium was removed by gently scraping. The tissue was minced and allowed to adhere to the culture flask by incubation in a small amount of DMEM containing 10% FBS. VSMC were characterized by  $\alpha$ -actin positive staining.

### Analysis of mRNA levels in the tissues and culture cells

Tissues were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. The total RNA from cell cultures was extracted using

Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcription of 1  $\mu$ g RNA using the High-Capacity cDNA Archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA expression of the selected genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT using pre-designed validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/ $\beta$ -actin ratios.

### Analysis of prostanoids in the Tissue-conditioned media

Tissue-conditioned media were obtained from approximately 150 mg of NA and AAA aorta fragments by incubating the tissues in 1 mL serum-free DMEM (Biological Industries,) in a cell incubator for 48 hours. The medium was then recovered and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Released  $\text{PGE}_2$  and 6-oxo-PGF $_{1\alpha}$  (the stable metabolite of PGI $_2$ ), were analyzed by EIA (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions. To evaluate levels of  $\text{PGE}_2$  metabolites (MPGE $_2$ ) we used an enzyme immunoassay (EIA) kit that converts 13,14-dihydro-15-oxo metabolites of  $\text{PGE}_2$  into a single stable derivative (Cayman Chemical) following manufacturer's instructions.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed using a rabbit polyclonal antibody against 15-PGDH (diluted 1:150) from Cayman Chemical. Three-micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex Kit. Diaminobenzidine was used as chromogen.

### Double-fluorescence immunostaining

For antigen co-localization studies, double-fluorescence immunostaining was performed using a sequential method. After deparaffinization and antigen retrieval, blocking for non-specific binding was performed at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. Appropriate concentrations of antibodies were then sequentially applied for 1 hour at room temperature, with PBS washing after each incubation. Slides were first incubated with anti-CD45, anti-CD68, CD20 or CD3 (IR751, IR7613, IR604 and IR503 without further dilution, Dako), followed by incubation with Alexa Fluor 594 goat-antimouse IgG (diluted 1/200; Life Technologies). Next, slides were incubated with the anti-15-PGDH antibody followed by incubation with Alexa Fluor 488 goat-antirabbit IgG (diluted 1/200; Life Technologies). As a negative control, sections were incubated omitting primary antibodies. Samples were then mounted with ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Life Technologies Co, Eugene, OR). Images were obtained using an SP5 Leica confocal microscope.

### Statistical analysis

Sigma-Plot software was used for statistical analysis. All data regarding transcript levels are expressed relative to  $\beta$ -actin x1000. All quantitative data in this study were non-normally distributed. We used the Mann-Whitney Rank Sum Test to compare the two groups. The Pearson Product Moment Correlation was used to evaluate the association between continuous variables after Log $_{10}$  transformation of data with non-normal distribution. A "P" value below 0.05 was considered significant.

**Table 1. Clinical characteristics of individuals with AAA and NA included in the study.** Demographics and risk factors.

Measurements	mRNA		Secretion*	
	AAA	NA	AAA	NA
Characteristic				
Number	39	15	30	12
Aortic diameter (mm)	70.4±13.9	-	67.5±13.7	-
Age (years)	71.7±7.8	58.4±13.9	71.7±8.1	59.1±15.2
Male	39 (100%)	7 (46.7%)	30 (100%)	6 (50%)
Diabetes mellitus	7 (17.9%)	2 (13.3%) <sup>a</sup>	5 (16.7%)	2 (16.7%)
Hypertension	26 (66.7%)	2 (13.3%) <sup>a</sup>	21 (70%)	1 (8.3%)
Hyperlipidemia	22 (56.4%)	2 (13.3%) <sup>a</sup>	20 (66.7)	1 (8.3%)
Smokers	10 (25.6%)	3 (20%) <sup>a</sup>	9 (30%)	2 (16.7)
Coronary artery disease	10 (25.6%)	0 <sup>a</sup>	10 (33.3%)	0 <sup>a</sup>
Chronic renal insufficiency	21 (53.8%)	0 <sup>a</sup>	18 (60%)	0 <sup>a</sup>
Peripheral vascular disease	19 (48.7%)	0 <sup>a</sup>	16 (53.3%)	0 <sup>a</sup>
Cerebrovascular disease	4 (10.3%)	1 (6.7%) <sup>a</sup>	2 (6.7%)	1 (8.3%)
COPD	7 (17.9%)	0 <sup>a</sup>	7 (23.3%)	0 <sup>a</sup>
Antiplatelet users	22 (56.4%)	1 (6.7%) <sup>a</sup>	14 (46.7%)	1 (8.3%)
Statins users	24 (61.5%)	0 <sup>a</sup>	18 (60%)	0 <sup>a</sup>
IECAs users	11 (28.2%)	0 <sup>a</sup>	7 (23.3%)	0 <sup>a</sup>
NSAID users	2 (5.1%)	0 <sup>a</sup>	3 (10%)	0 <sup>a</sup>
Corticoid users	2 (5.1%)	0 <sup>a</sup>	2 (6.7%)	0 <sup>a</sup>
Immuno-suppressors users	1 (2.6%)	0 <sup>a</sup>	1 (3.3%)	0 <sup>a</sup>

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean±SD. Abbreviations: Aortic diameter: aneurysm maximum transverse diameter in mm. Chronic renal insufficiency: estimated glomerular filtration rate (eGFR) ≤60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Smokers: smoking in the last year. COPD: chronic obstructive pulmonary disease. Secretion\*: prostanoid secretion by NA and AAA samples.

<sup>a</sup> In some cases due to the nature of NA samples some of the clinical characteristics are not always recorded and infra-evaluation of them is probable.

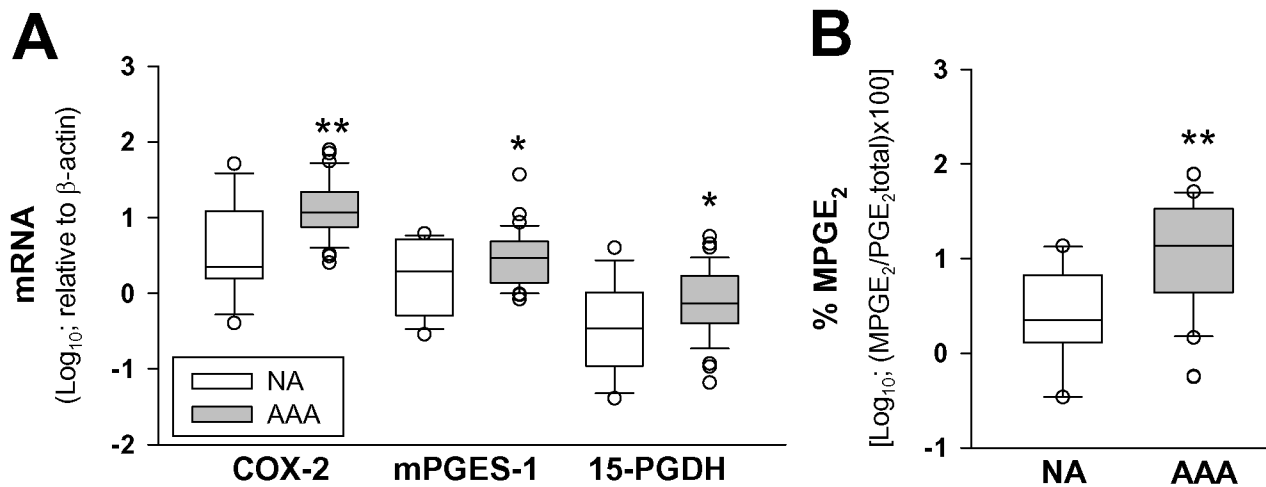
doi:10.1371/journal.pone.0136201.t001

## Results

[Table 1](#) summarizes the characteristics of patients and donors included in this study. We analyzed the expression of 15-PGDH, COX-2 and mPGES-1 in AAA samples with NA by quantitative RT-PCR. The expression levels of any RNA transcripts did not fit a normal distribution. Results in [Fig 1A](#) show that, as expected [16], COX-2 and mPGES-1 expression was increased in AAA samples and that 15-PGDH mRNA was also significantly higher in AAA than in NA samples. Results regarding 15-PGDH were consistent with a significantly high ratio of metabolized PGE<sub>2</sub> respect to total PGE<sub>2</sub> in the tissue-conditioned media from AAA tissue samples than in NA ([Fig 1B](#)). As gender composition was different in AAA and NA populations, we tested for differences in the levels of 15-PGDH between males and females in the NA group (AAA group was 100% males) but found no statistically significant difference between genders.

Attempting to ascertain if PGE<sub>2</sub> degradation occurs in AAA microvessels, we determined the correlation between mRNA levels of 15-PGDH and those of MVEC and leukocyte markers. We analyzed the expression of the von Willebrand factor (vWF) and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) as endothelial cell markers and CD45 and CD68 as leukocyte markers. Cell markers analyzed were significantly enhanced in AAA samples ([Fig 2A](#)). Correlations between 15-PGDH and MVEC markers were not significant ([Fig 2B](#)), but 15-PGDH transcript levels were significantly associated with both leukocyte markers. The correlation of 15-PGDH with the macrophage marker CD68 was less significant than with the pan-leukocyte marker CD45 ([Fig 2C](#)).





**Fig 1. The expression of PGE<sub>2</sub> biosynthetic and catabolic enzymes is increased in AAA.** **A**, Box plot of expression levels of COX-2, mPGES-1 and 15-PGDH in controls (NA, n = 15) and abdominal aortic aneurysm (AAA, n = 39) samples; \* p<0.05, when compared with NA samples. **B**, Box plot of the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> (MPGE<sub>2</sub>) in NA (n = 12) and AAA (n = 30) samples; \* p<0.01, when compared with NA samples.

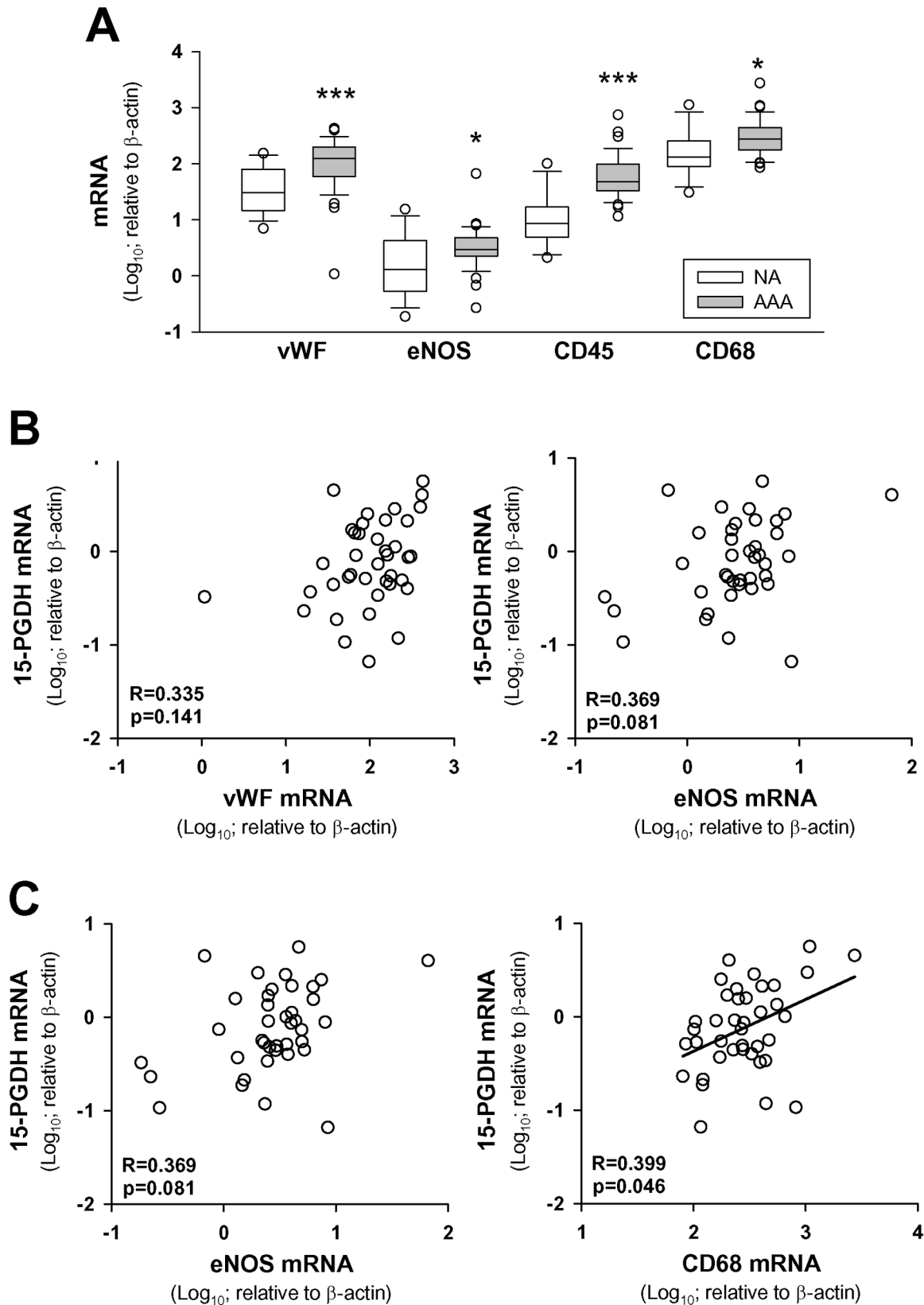
doi:10.1371/journal.pone.0136201.g001

In an attempt to approach the relative contribution of the endothelium to PGE<sub>2</sub> production and degradation in AAA, we determined the statistical association of PGE<sub>2</sub> levels with other cell-characteristic prostanoids secreted by AAA samples as independent variables. We evaluated PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> metabolites (MPGE<sub>2</sub>) and 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>, the stable metabolite of PGI<sub>2</sub>, which is not produced by leukocytes. As Fig 3A shows, a significant positive correlation was found between the production of PGE<sub>2</sub> total and PGI<sub>2</sub> (in terms of its stable metabolite) by AAA samples. We also observed a positive statistical association between levels of MPGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> (Fig 3B). Nevertheless, the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> showed a significant negative correlation with the total amount of PGE<sub>2</sub> (Fig 3C) and with PGI<sub>2</sub> (Fig 3D),

Our results indirectly indicated that PGE<sub>2</sub> production was associated with PGI<sub>2</sub>-producing cells, and that degradation of PGE<sub>2</sub> was negatively associated with the PGI<sub>2</sub> production. We therefore performed immunohistochemistry to locate 15-PGDH in AAA and NA samples. Fig 4A show examples of the 15-PGDH immunostaining in NA and AAA samples. 15-PGDH protein was not found in NA samples and immunostaining in AAA samples was located in the areas of leukocyte infiltration. Immunofluorescent double staining showed that 15-PGDH was mainly associated with CD45-positive cells but also with cells expressing the macrophage marker CD68 (Fig 4B). To ascertain whether infiltrating lymphocytes accounted for 15-PGDH expression in AAA samples, we performed double immunofluorescence staining of the 15-PGDH and T-cell (CD3) and B-cell (CD20) markers. Results in Fig 4B show that 15-PGDH co-localize with both lymphocyte markers.

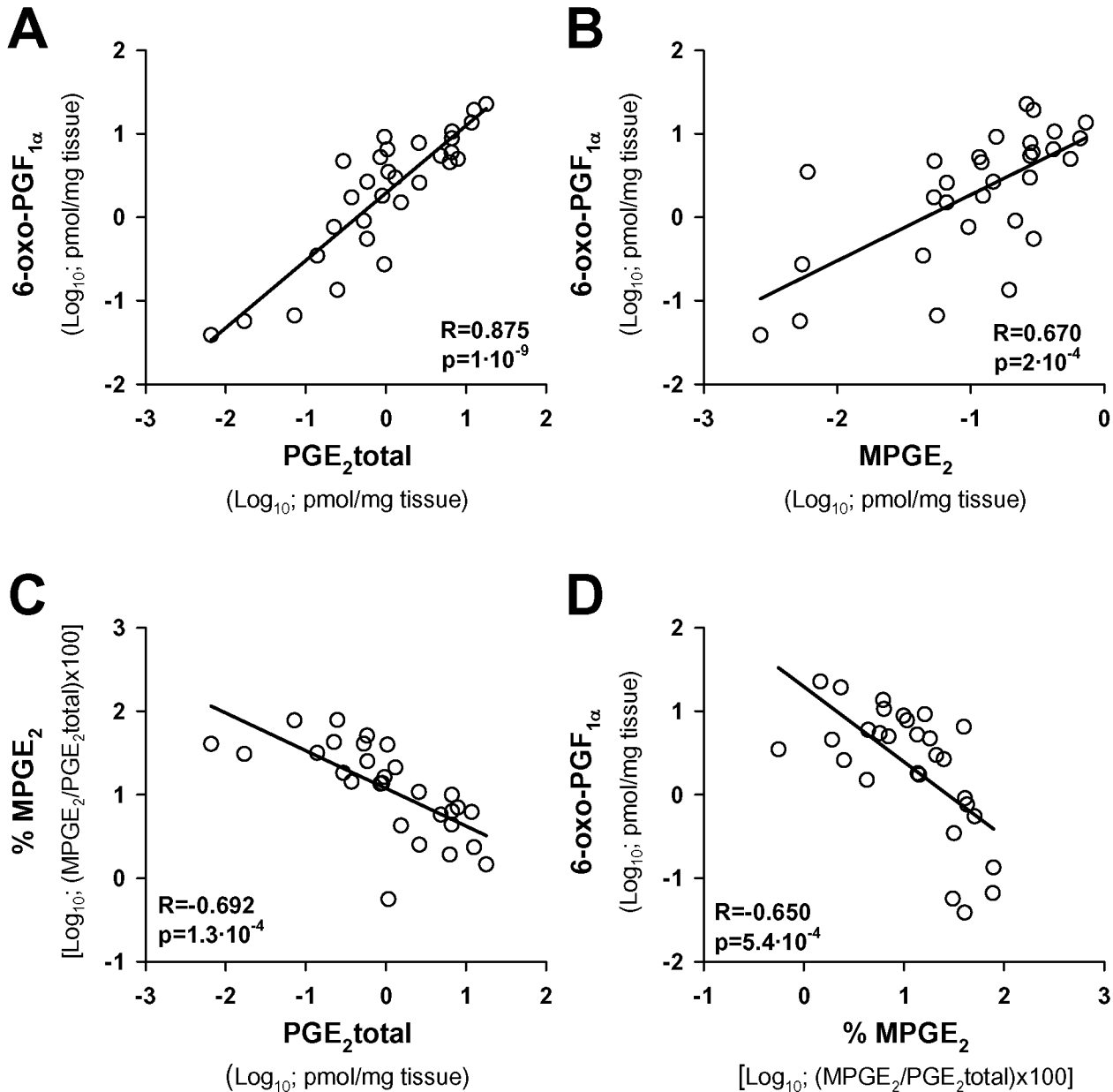
## Discussion

This study describes the expression of the 15-PGDH in human abdominal aortic aneurysm (AAA) for the first time. We found that 15-PGDH mRNA in aortic biopsies from AAA patients was significantly increased compared with aortic biopsies from healthy donors and its expression was mainly associated with infiltrating leukocytes. The MVEC COX-2/mPGES-1/EP-4 axis is relevant for PGE<sub>2</sub>-mediated hypervascularization from the early stages of human AAA development [16]. Here we confirmed our previous results [16] showing that expression



**Fig 2. 15-PGDH expression is associated with leukocyte markers in AAA.** **A**, Box plot of expression levels of cell markers in controls (NA, n = 15) and abdominal aortic aneurysm (AAA, n = 39) samples; \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 when compared with NA samples. **B** Statistical correlations between transcript levels of 15-PGDH and endothelial cell markers in AAA samples; **C**, statistical correlations between transcript levels of 15-PGDH and leukocyte markers in AAA samples. Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data and Bonferroni's correction for multiple testing was applied; (n = 39.)

doi:10.1371/journal.pone.0136201.g002



**Fig 3. PGE<sub>2</sub> production is associated with PGI<sub>2</sub>-producing cells.** **A**, Statistical correlation between levels of 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> and total PGE<sub>2</sub> secreted by AAA samples; **B**, statistical correlation between levels of 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> and PGE<sub>2</sub> metabolites (MPGE<sub>2</sub>) secreted by AAA samples. **C**, Statistical correlation between the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> secreted by AAA samples [%MPGE<sub>2</sub>; (MPGE<sub>2</sub>/totalPGE<sub>2</sub>)\*100] and total PGE<sub>2</sub>; **D**, statistical correlation between secreted levels of 6-oxo-PGF<sub>1α</sub> and %MPGE<sub>2</sub>. Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data and Bonferroni's correction for multiple testing was applied; (n = 30).

doi:10.1371/journal.pone.0136201.g003

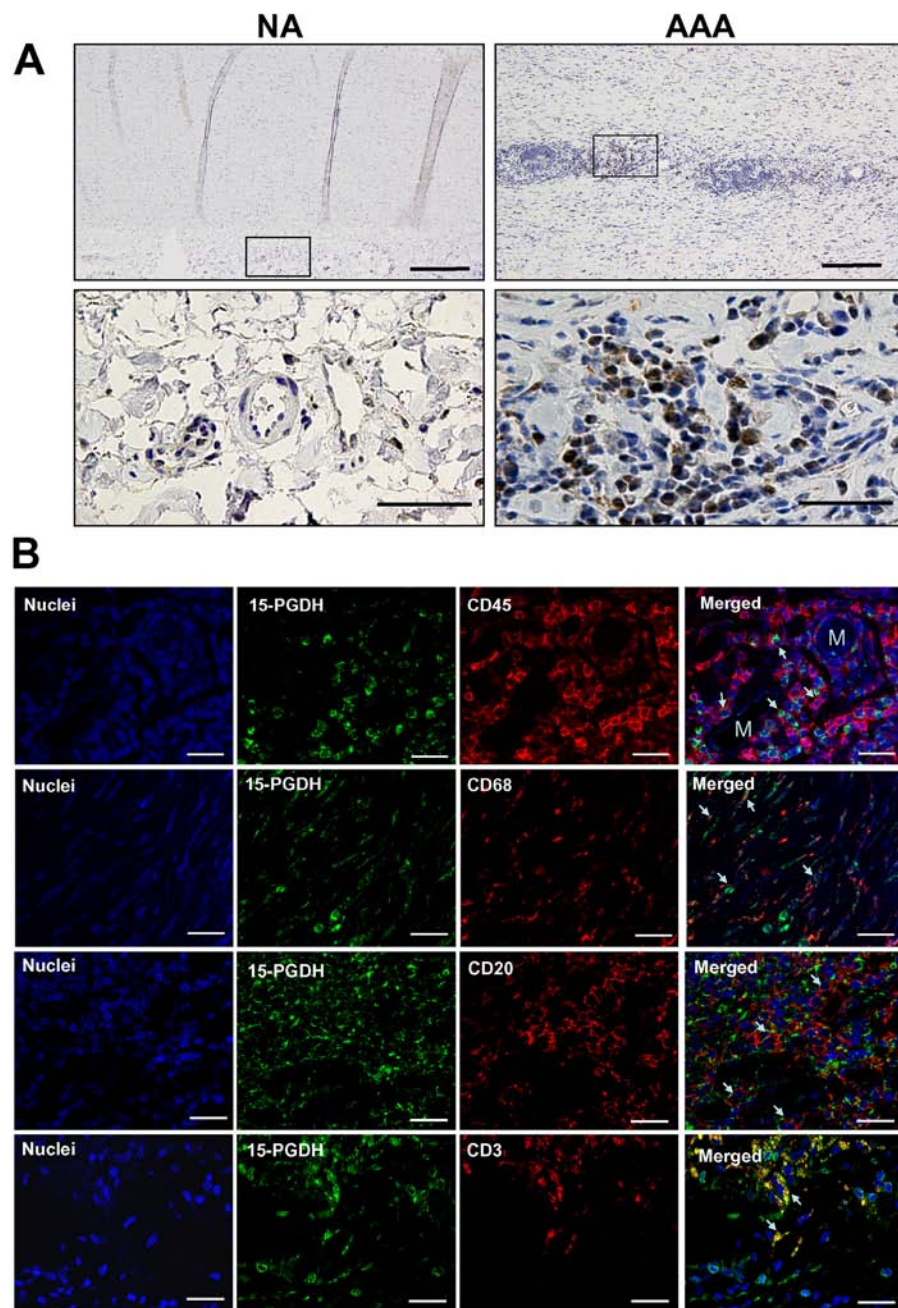


Figure 4

**Fig 4. 15-PGDH expression in AAA is mainly associated to CD45 cells.** **A**, Representative immunohistochemistry images of 15-PGDH in NA and AAA samples, arrows show medial leukocyte immunostained with anti-15-PGDH; bars are 200 $\mu$ m (upper panels) and 50 $\mu$ m (lower panels). **B**, Representative immunofluorescent double staining for 15-PGDH and leukocyte markers in leukocyte infiltration areas; arrows show double immunostained cells; M indicates the light of microvessels; bars are 25 $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0136201.g004

of the PGE<sub>2</sub>-biosynthetic machinery, including COX isoenzymes and mPGES-1, is increased in human AAA. Nevertheless, the PGE<sub>2</sub> degradation rate also contributes to this activity.

15-PGDH is the first enzyme responsible for the biological inactivation of PGE<sub>2</sub> [19–21]. Here we found that 15-PGDH was upregulated in AAA, and consistently, the amount of mPGE<sub>2</sub> secreted by AAA samples was higher than that secreted by NA. We previously reported that when patients were stratified according to the aortic diameter, the transcript levels of endothelial cell-markers and PGE<sub>2</sub>-biosynthetic enzymes were highest in the small diameter group (<55mm), while transcript levels of leukocyte markers were highest in the moderate diameter group (55–69.9mm) [16]. These observations led us to hypothesize that angiogenesis precedes the maximum inflammatory response during AAA development. Identifying the role of microvascular endothelium in PGE<sub>2</sub>-induced neovascularization in AAA, is a key question [2,23–25]. We therefore need to clarify whether the enhanced expression of 15-PGDH and hence PGE<sub>2</sub> degradation occurs in microvessels or in the infiltrating immune cells.

In the present study, transcript levels of 15-PGDH were associated with the pan-leukocyte marker CD45 and also with the macrophage marker CD68, but to a lesser extent. These results indicate that 15-PGDH is associated not only with the macrophage population but also with other infiltrating leukocytes.

We confirmed our previous results showing that expression of COX-2 and mPGES-1 were increased in AAA [16]. COX-2 was found to be highly expressed in vascular cells and infiltrating leukocytes in AAA but weakly expressed in NA, suggesting that it was effectively up-regulated in vascular cells, including MVEC. We also observed that mPGES-1 was increased in AAA but the increase of mPGES-1 expression was not as high as that of COX-2 [16]. mPGES-1 immunoreactivity was located in all vascular cells including VSMC in both NA and AAA. In our previous work we proposed that a factor that could explain the modest increase of mPGES-1 found in AAA could be the breakdown of VSMC in AAA. Indeed, VSMC abundantly express mPGES-1 [10,11]. Our previous data indicated that both vascular cells and leukocytes potentially contribute to PGE<sub>2</sub> biosynthesis [16]. The contribution of the different cell types present in aneurysmatic tissue to the PGE<sub>2</sub> pool cannot be evaluated directly without seriously modifying tissue samples. In this work, we therefore used an indirect strategy to approach this matter. PGI-synthase is expressed in vascular cells—mainly in the endothelium—but not in leukocytes. We observed an excellent positive statistical association between the total secretion of PGE<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> (in terms of 6-oxo-PGF<sub>1α</sub>) in aorta samples from AAA patients. This indicates that the biosynthesis of PGE<sub>2</sub> in AAA would be associated with the cells producing PGI<sub>2</sub> suggesting that MVEC contribute strongly to PGE<sub>2</sub> biosynthesis in the AAA wall. Nevertheless, this circumstantial evidence should be corroborated by further studies. When we tested the statistical association between the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> and total production of PGE<sub>2</sub> we observed a negative significant correlation. As expected, similar results were obtained when we analyzed the association between levels of PGI<sub>2</sub> and the percentage of metabolized PGE<sub>2</sub> secreted to the incubation media. Moreover, we did not find 15-PGDH expression in terms of mRNA, either in MVEC or in aortic VSMC in culture (data not show). Altogether these results are consistent with the idea that PGE<sub>2</sub> synthesized by the vascular endothelium is not inactivated *in situ*.

To confirm that 15-PGDH was mainly expressed in infiltrating leukocytes we performed immunohistochemistry and immunofluorescence studies. We did not observe 15-PGDH immunostaining in NA samples but analysis of AAA samples showed 15-PGDH immunostaining, mainly in the perivascular areas where the density of infiltrating leukocytes was highest [16]. The double immunofluorescence study showed coexpression of 15-PGDH with the leukocyte marker CD45, and to a lesser extent with the macrophage marker CD68, reinforcing the results obtained at mRNA level.

The presence of mPGES-1 in a particular cell is necessary for PGE<sub>2</sub> biosynthesis [9–12,26,27]. In inflammatory diseases it is generally accepted that PGE<sub>2</sub> comes from invading leukocytes, mainly macrophages. Macrophage COX-2-derived PGE<sub>2</sub> is relevant in the pathogenesis and rupture of AAA [3,13–15]. Nevertheless, expression of 15-PGDH effectively regulates active PGE<sub>2</sub> present in a particular cell type. We previously reported that MVEC express the PGE<sub>2</sub> biosynthetic machinery [16,17]. We now add that 15-PGDH is expressed in leukocytes, thereby causing greater inactivation of PGE<sub>2</sub> in these cells than in MVEC. Hypervascularization *per se* could be a determinant factor in reducing mechanical strength, because it turns the media layer spongy and favors leukocyte-mediated matrix degradation. We have shown that EP-4 activation, which is the main PGE-receptor in endothelial cells, induces angiogenesis [16,28]. Accordingly, MVEC-derived PGE<sub>2</sub> could play key role in the AAA-associated hypervascularization since PGE<sub>2</sub> could be more effective inducing angiogenesis in an autocrine manner.

In conclusion, we found that 15-PGDH, the first enzyme involved in PGE<sub>2</sub> inactivation, is upregulated in AAA and its expression is mainly associated with infiltrating leukocytes. Considering that PGE<sub>2</sub> plays a relevant role in angiogenesis, our results suggest that MVEC-derived PGE<sub>2</sub> acts in the AAA-associated hypervascularization in an autocrine manner and that switching of endothelium to an inflammatory phenotype is a key point in AAA development.

## Acknowledgments

We thank Laura Sigüero, Sonia Alcolea, Montserrat Gómez, Iris Rodríguez and Eva Companys for their excellent technical support, and Carolyn Newey for editorial support.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DSV JFD BS LV JRE MC. Performed the experiments: DSV JFD BS CR. Analyzed the data: JFD LV MC. Wrote the paper: LV MC. Interpretation of data for the work: JRE CR JMG LV MC. Revised the work critically for important intellectual content: JFD JRE CR JMG. Data collection: JFD JRE BS.

## References

1. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8: 92–102. doi: [10.1038/nrcardio.2010.180](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.180) PMID: [21079638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21079638/)
2. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WR, Sayed S, Loftus IM, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2077–2082. PMID: [16809548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16809548/)
3. Holmes DR, Wester W, Thompson RW, Reilly JM. Prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1997; 25: 810–815. PMID: [9152308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9152308/)
4. Gitlin JM, Trivedi DB, Langenbach R, Loftin CD. Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovasc Res* 2006; 73: 227–236. PMID: [17137566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17137566/)
5. Wang M, Lee E, Song W, Ricciotti E, Rader DJ, Lawson JA, et al. Microsomal prostaglandin H synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation* 2008; 117: 1302–1309. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731398](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.731398) PMID: [18285567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18285567/)
6. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193–1226. PMID: [10508233](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10508233/)
7. Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med Res Rev* 2004; 24: 399–424. PMID: [15170590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15170590/)
8. Bishop-Bailey D, Mitchell JA, Warner TD. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 956–958. PMID: [16627818](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16627818/)

9. Solà-Vilà D, Camacho M, Solà R, Soler M, Diaz JM, Vila L. IL-1beta induces VEGF, independently of PGE2 induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells. *Kidney Int* 2006; 70: 1935–1941. PMID: [17035941](#)
10. Camacho M, Gerbolés E, Escudero J-R, Antón R, García-Moll X, Vila L. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE<sub>2</sub> biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemostas* 2007; 5: 1411–1419.
11. Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iñiguez MA, Vila L. Human Vascular Smooth Muscle Cells but not Endothelial Cells Express Prostaglandin E Synthase. *Circ Res* 2000; 87: 504–507. PMID: [10988243](#)
12. Salvado MD, Alfranca A, Escolano A, Haeggström J, Redondo JM. COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH<sub>2</sub> for transcellular metabolism to PGE<sub>2</sub> by tumor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 1131–1137. doi: [10.1161/ATVBAHA.109.188540](#) PMID: [19423863](#)
13. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW, et al. Inhibition of prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in abdominal aortic aneurysms. Implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 1999; 100: 48–54. PMID: [10393680](#)
14. Chapple KS, Parry DJ, McKenzie S, MacLennan KA, Jones P, Scott DJ. Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2007; 21: 61–66. PMID: [17349338](#)
15. Cheuk BL, Cheng SW. Differential secretion of prostaglandin (E<sub>2</sub>), thromboxane A<sub>2</sub> and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysm. *Int J Mol Med* 2007; 20: 391–395. PMID: [17671746](#)
16. Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, Rodríguez C, Bellmunt S, Siguero L, et al. Microvascular COX-2/ mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res* 2013; 54: 3506–3515. doi: [10.1194/jlr.M042481](#) PMID: [24133193](#)
17. Casós K, Siguero L, Fernández-Figueras MT, León X, Sardá MP, Vila L, et al. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc Res* 2011; 81: 261–268. doi: [10.1016/j.mvr.2011.01.006](#) PMID: [21277871](#)
18. Tai HH, Ensor CM, Tong M, Zhou H, Yan F. Prostaglandin catabolizing enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68/69: 483–493.
19. Anggard E, Larsson SC, Samuelsson B. The distribution of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase and prostaglandin D<sub>13</sub>-reductase in tissues of the swine. *Acta Physiol Scand* 1971; 81: 396–404. PMID: [5550521](#)
20. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12098–12102. PMID: [16880406](#)
21. Wolf I, O'Kelly J, Rubinek T, Tong M, Nguyen A, Lin BT, et al. 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase is a tumor suppressor of human breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7818–7823. PMID: [16885386](#)
22. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al, CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604–612. PMID: [19414839](#)
23. Brú A, Souto JC, Alcolea S, Antón R, Remacha A, Camacho M, et al. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro. Possible applications for neutrophil-based anti-tumour treatment *Mediat Inflamm* 2009, ID 817498.
24. Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991; 11: 1667–1677.
25. Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp Mol Med* 2004; 36: 524–533. PMID: [15665585](#)
26. Camacho M, López-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ Res* 1998; 83: 353–365. PMID: [9721692](#)
27. Camacho M, Vila L. Transcellular formation of thromboxane A<sub>2</sub> in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb Res* 2000; 99: 155–164. PMID: [10946089](#)
28. Camacho M, Piñeiro Z, Alcolea S, García J, Balart J, Terra X, et al. Prostacyclin-synthase expression in head and neck carcinoma patients and its prognostic value in the response to radiotherapy. *J Pathol* 2015; 235: 125–135. doi: [10.1002/path.4453](#) PMID: [25256272](#)