



REVISIÓN

Métodos de estudio de las enfermedades complejas: aneurismas de la aorta abdominal

J.M. Soria^{a,*}, J.F. Dilmé^{b,c}, J. Martínez-González^d, M. Camacho^c, C. Rodríguez^d, J.M. Romero^{b,c}, S. Bellmunt^{b,c}, J.R. Escudero^{b,c} y L. Vila^c

^aUnitat de Genòmica de Malalties Complexes. II-B Sant Pau. Barcelona. España.

^bServei de Angiología, Cirugía Vascular i Endovascular. II-B Sant Pau. Barcelona. España.

^cLaboratori de Angiología, Biología Vascular e Inflamació. II-B Sant Pau. Barcelona. España.

^dCentre de Investigació Cardiovascular (CSIC-ICCC). Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Recibido el 1 de marzo de 2010; aceptado el 20 de marzo de 2010

PALABRAS CLAVE

Enfermedad compleja; Aneurismas; Bases genéticas; Proyecto TAGA

Resumen

Las enfermedades vasculares, particularmente el aneurisma de la aorta abdominal (AAA), tienen una base multifactorial compleja, donde múltiples interacciones entre factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, pese a los avances en la última década, nuestros conocimientos sobre la base genética de estas patologías son aún escasos. Este artículo presenta una revisión de los métodos para el estudio de las bases genéticas de las enfermedades vasculares focalizada en el AAA desde un enfoque de enfermedad compleja, y de índole multifactorial. La identificación y el análisis de los genes causantes de esta patología nos permitirán realizar una estratificación de los individuos con diferentes riesgos de desarrollar esta patología, mejorando las opciones preventivas y terapéuticas, lo que se traducirá en una mayor calidad de vida de las personas en riesgo.

© 2010 SEACV. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Complex disease; Aneurysms; Genetic basis; TAGA Project

Methods for studying complex diseases: abdominal aortic aneurysm

Abstract

The aetiology of vascular diseases, such as abdominal aortic aneurysm (AAA), is complex and multi-factorial. The complexity derives from different genetic and environmental factors contributing to the development of these diseases. Despite the fact that a great effort has been made in the last decade to understand the genetic basis of these complex diseases there is still much to be learned. The present review deals with the methods that have been used to study the genetic bases of vascular diseases. In addition, we will focus on AAA as a complex

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jsoria@santpau.cat (J.M. Soria).

multi-factorial disease. The identification of the genes involved in the pathophysiology of AAA will allow us to stratify individuals with different risks of developing disease, as well as improving preventive and therapeutic strategies. All of this will increase the quality of life of the persons who are at risk.

© 2010 SEACV. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción y objetivos

En la última década se ha producido un avance revolucionario en el campo de la Genética Humana, permitiendo la transición del análisis clásico de enfermedades monogénicas al acercamiento a la base genética de las enfermedades comunes y complejas como la obesidad, la diabetes, el cáncer, la hipertensión, el asma o las enfermedades vasculares. Sin embargo, pese a los esfuerzos realizados en el estudio de las enfermedades vasculares, nuestros conocimientos sobre la base genética de estas patologías son escasos. Los avances actuales en genómica vaticinan un notable incremento de dichos conocimientos, principalmente gracias al proyecto Genoma Humano. La identificación y el análisis de los genes causantes de estas patologías nos permitirán realizar una estratificación de los individuos con diferentes riesgos genéticos, mejorando las opciones preventivas y terapéuticas, lo que se traducirá en una mayor calidad de vida de los individuos en riesgo. Este artículo presenta una revisión de los métodos para el estudio de las bases genéticas de las enfermedades vasculares focalizada en los aneurismas de la aorta abdominal (AAA) desde un enfoque de enfermedad compleja, y de índole multifactorial.

Desarrollo

Métodos de estudio de las enfermedades complejas

Se entiende por enfermedad compleja aquella patología causada por el efecto de varios genes y de la interacción entre ellos y con el ambiente. A diferencia de las enfermedades monogénicas mendelianas, el tener un gen defectuoso no causa necesariamente la enfermedad, sino que solamente modifica el riesgo de padecerla. Localizar los genes y sus variantes alélicas, llamados polimorfismos, responsables de la variación en rasgos complejos de importancia médica, y determinar su contribución al riesgo de padecer la enfermedad en diferentes ambientes constituye uno de los mayores retos para la biología en la era genómica. El estudio de las enfermedades complejas ha sufrido una evolución conceptual, que ha ido paralela a un gran desarrollo de las técnicas de Genética Molecular, como la automatización de los métodos de genotipado de marcadores y secuenciación de ADN. Además, los avances en Estadística Genética y en computación, en particular en los últimos años, han propiciado el desarrollo de métodos matemáticos cada vez más eficaces para la disección genética de rasgos cuantitativos complejos.

Sin embargo, la identificación de los genes y sus polimorfismos que confieren un mayor riesgo de padecer una enfermedad compleja no es una tarea fácil¹. El diseño del

estudio y la utilización de los métodos de análisis apropiados son puntos críticos. Los diseños experimentales utilizados en la identificación y localización de genes pueden ser de dos tipos: estudios de asociación y análisis de ligamiento genético². Los primeros son buenos para analizar genes conocidos, mientras que los segundos lo son, generalmente, para localizar nuevos genes. Por lo tanto, ambos métodos son complementarios más que antagonistas. La cuestión no es tanto qué diseño utilizar, sino cuándo y cómo debe aplicarse cada método. Este constituye uno de los debates más controvertidos en la actualidad en el campo de la genética de las enfermedades complejas: asociación frente a ligamiento.

Los estudios de asociación caso-control analizan la correlación entre fenotipo y genotipo. El fenotipo es usualmente la presencia —casos— o ausencia —controles— de la enfermedad en individuos no relacionados o en familias. El genotipo viene determinado por algún tipo de polimorfismo genético. Existe asociación cuando la distribución, es decir la frecuencia alélica, de este marcador es estadísticamente diferente en los casos y en los controles. El marcador genético es un polimorfismo dentro o cerca de un gen candidato, definido como un gen específico relacionado biológicamente con el proceso de la enfermedad.

Aunque este tipo de estudios proporciona evidencias indirectas importantes sobre efectos genéticos, una relación de asociación no implica necesariamente causalidad. Se analizan uno o varios polimorfismos conocidos en un gen candidato asumiendo que son funcionales. Sin embargo, la mayor parte de la variabilidad en esos genes candidatos es desconocida y muchas veces no existe ninguna evidencia fisiológica o bioquímica de que el polimorfismo analizado sea funcional. Este diseño es totalmente inadecuado como punto de partida para investigar causas genéticas en las enfermedades complejas^{2,3}. Desde el punto de vista estadístico también presentan serios problemas³, como es la alta propensión a generar falsos positivos debidos a la estratificación de la población cuando se utilizan individuos no emparentados entre ellos o al análisis simultáneo de múltiples polimorfismos sin utilizar los factores correctores necesarios. Otro punto discutible de los estudios de asociación viene dado cuando se encuentra una asociación positiva. En este caso, no se puede demostrar que el polimorfismo analizado sea realmente el que aumenta el riesgo de padecer la enfermedad, sino que el causante podría ser otro polimorfismo en desequilibrio de ligamiento con él. Por otra parte, una asociación negativa tampoco excluye que el gen estudiado no esté implicado en el riesgo de padecer la enfermedad, simplemente indica que el polimorfismo del gen que se ha utilizado en el análisis no está suficientemente ligado al que realmente causa el riesgo³.

Tradicionalmente, el estudio de las enfermedades complejas se ha basado casi exclusivamente en estudios de asociación, cuyo éxito es cuestionable. Para ilustrar este punto, una reciente revisión de la literatura encuentra 600 asociaciones positivas entre polimorfismos genéticos (pertenecientes a 268 genes) y 133 enfermedades comunes⁴. Es decepcionante que sólo 166 de estas asociaciones hayan sido reportadas más de dos veces. Y sólo 6 han sido consistentemente encontradas en más del 75% de estos estudios. Valgan como ejemplos la enfermedad de Alzheimer con un polimorfismo en la apo-E, y la trombosis venosa con el Factor V Leiden.

El análisis de ligamiento genético se basa en la cosegregación, o sea la transmisión de los padres a su descendencia, de un marcador genético y una variante genética funcional. La cosegregación de un marcador genético sólo se puede detectar observando cómo se heredan los cromosomas de una generación a otra, lo que necesariamente implica el reclutamiento de individuos emparentados en familias.

Los análisis de ligamiento genético permiten demostrar la cosegregación de una enfermedad dentro de una familia y las variantes genéticas responsables. Es decir, establecen relaciones inequívocas de causa-efecto. Existe diferentes diseños para este tipo de análisis: estudio de gemelos, pares de hermanos, familias nucleares o familias extensas. Es necesario puntualizar que cualquiera de estos diseños experimentales también permite realizar análisis de asociación. Sin embargo, los estudios familiares, a diferencia de los estudios de asociación, son los únicos que permiten detectar genes desconocidos causantes de enfermedad.

Los efectos genéticos se cuantifican en términos de heredabilidad (h^2), que es la proporción de la variación en un fenotipo cuantitativamente evaluable atribuible exclusivamente al efecto de los genes. La estimación de la h^2 es un paso previo indispensable antes de intentar la localización de los genes, puesto que si el fenotipo no tiene h^2 o bien ésta es muy pequeña —por ejemplo, menor del 10%—no tiene sentido práctico la búsqueda de genes.

La herramienta matemática básica para abordar el estudio de las enfermedades complejas y sus fenotipos intermedios es el análisis de la varianza, que permite separar el efecto debido a los factores genéticos y a los factores ambientales, que influyen en un fenotipo cuantitativo y en la enfermedad compleja en estudio.

Una vez demostrado que un fenotipo —por ejemplo, la enfermedad— es heredable, el siguiente paso es localizar las regiones cromosómicas (*locus*) que contienen genes que influyen en la variabilidad de ese fenotipo; cada uno de estos *locus* se conoce como QTL (*quantitative trait locus*). La localización de los QTL se consigue con el análisis de ligamiento genético. Una de las aproximaciones estadísticas más robustas y poderosas para realizar este tipo de análisis está basada en los componentes de la varianza (*variance-components linkage analyses*) en familias extensas⁵. La idea es que parientes que se asemejan más para un determinado fenotipo —por ejemplo, niveles de fibrinógeno— deben compartir más alelos en los marcadores alrededor del gen que está influyendo ese fenotipo, mientras que otros parientes que sean más dispares para el fenotipo bajo estudio no serán portadores de alelos idénticos.

Detección, localización e identificación de QTL implicados en enfermedades complejas

En la era post-genómica la estrategia para entender la arquitectura genética de las enfermedades complejas sigue un procedimiento rutinario específico. Primero, la localización de las regiones cromosómicas implicadas en la variabilidad del fenotipo en estudio, a través de un análisis global del genoma. Inicialmente se usan marcadores separados uno de otro 10 cM (unidades de recombinación genética), que genera una región candidata de entre 20 a 30 cM alrededor de la señal de ligamiento genético. En término medio, a lo largo del genoma 1 cM corresponde con 1 Mega-base (Mb), vale decir un millón de pares de bases de secuencia de ADN. Dada la densidad de genes funcionales por Mb, una región de 20 cM puede contener más de 100 *loci* funcionales que codifican para proteínas. El siguiente paso es lo que se conoce con la denominación *fine mapping* (mapeado fino), que se refiere al refinamiento o acotación de la región genómica candidata saturándola con marcadores adicionales para obtener un mapa genético con marcadores espaciados entre 1 y 3 cM. Una vez reducida la región candidata a 1-3 cM, aún puede quedar una ardua tarea hasta identificar el gen responsable de la variabilidad del fenotipo de interés. Es en este punto donde los estudios de asociación desempeñan un papel indispensable, ya que nos permitirán identificar el gen candidato implicado en el fenotipo que estamos estudiando, y estimar el tamaño del efecto genético que este QTL causa sobre dicho rasgo. El proyecto Genoma Humano puede contribuir enormemente a la identificación de genes, ya que aportará un catálogo completo de los genes ubicados en la región cromosómica de interés. Con esta información, la localización de estos genes queda reducida a la evaluación sistemática de genes candidatos.

Sin embargo, incluso una vez identificado el gen responsable de la señal de ligamiento genético observada (QTL), aún queda la identificación del nucleótido de caracteres cuantitativos (QTN), o sea los polimorfismos de ese gen que influyen en los fenotipos analizados y que pueden contribuir al riesgo de padecer la enfermedad. Para ello, el gen candidato debe ser secuenciado en su totalidad, incluyendo la zona promotora, exones, intrones y región 3'-no traducible (3'-UTR), debido a que existen evidencias de que variaciones en regiones no codificantes pueden influir en la regulación de la transcripción del gen o en otras funciones. Esta estrategia supone un cambio sustancial de orientación en el campo de la genética, donde la búsqueda de variantes alélicas se restringía solamente a zonas codificantes y al promotor.

Cuando todas las variantes alélicas de un gen hayan sido identificadas, el siguiente gran reto será saber las que son funcionales (Genómica Funcional). Actualmente, se están desarrollando métodos avanzados de estadística genética, que permitirán determinar qué polimorfismos identificados son funcionales, es decir responsables de la variabilidad en la expresión del gen en términos de proteína. Estos análisis serán imprescindibles antes de embarcarse en ensayos moleculares largos, complejos y costosos.

El aneurisma de la aorta abdominal como enfermedad compleja

Las enfermedades cardiovasculares son un buen ejemplo de enfermedades multifactoriales. El elevado número de siste-

mas implicados en estas patologías hace que variaciones en un gran número de genes puedan potencialmente influir en la variación interindividual del riesgo a padecer la enfermedad. La etiopatogenia de enfermedades cardiovasculares como la arteriosclerosis, la miocardiopatía hipertrófica, la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca o el AAA permanece esencialmente desconocida. En los últimos años se han ido acumulado evidencias que sustentan el concepto de que la causa del AAA es un proceso multifactorial sujeto a variaciones de susceptibilidad individual⁶⁻⁸.

Epidemiología del aneurisma de la aorta abdominal

La incidencia real de los AAA es desconocida por sus propias peculiaridades nosológicas, como enfermedad asintomática en más del 60-70% de los casos, y crecimiento lento e imprevisible^{9,10}. De forma indirecta, aplicando datos de población afectada, frecuentación hospitalaria o de mortalidad, podemos considerar como cifra probable de incidencia aneurismática, la aparición de 30-40 nuevos casos por 100.000 habitantes/ año¹⁰. La tasa de mortalidad por rotura de AAA se sitúa entre el 1-2% de la población adulta, en USA, Europa y Australia¹¹. Los estudios autópsicos muestran una tasa de prevalencia entre el 1-5% que aumenta con la edad y es más frecuente en los varones de raza blanca de edad avanzada¹²⁻¹⁴. Actualmente se considera que un 3% de la población masculina de edad superior a 50 años es "portadora" de un AAA, siendo este porcentaje inferior al 1% en el sexo femenino. La edad es un factor de riesgo importante, que aumenta de forma lineal la prevalencia aneurismática, siendo superior al 10% en varones mayores de 75 años^{15,16}.

La extrapolación de los datos epidemiológicos a la población española actual (45,2 millones de habitantes en enero de 2007) nos ofrece las siguientes cifras aproximadas:

- Prevalencia global: 290.000 AAA.
- Mortalidad por rotura aneurismática: 8.100-9.300 habitantes/ año.

Cuando estudiamos grupos de riesgo, encontramos los siguientes resultados:

- Familiares en primer grado de portadores de AAA: prevalencia entre el 15-27%^{7,18}.
- Pacientes portadores de arteriopatía periférica: prevalencia entre el 5 y el 15%¹⁹⁻²³.
- Pacientes con enfermedad vaso-cerebral de origen extracranial: prevalencia entre el 8 y el 12%^{24,25}.
- Pacientes con factores de riesgo vascular: se ha descrito una asociación entre aneurisma de aorta y tabaquismo, dislipidemia e hipertensión arterial^{26,27}.
- Pacientes con aneurismas en otras localizaciones (poplíteos, femorales, etc.): prevalencia de 20-40%^{5,28-30}.

Etiología de los aneurismas de la aorta abdominal

Existe una corriente de opinión que considera el AAA como una manifestación de la arteriosclerosis^{31,32}, aunque éste no es el único factor etiológico. De hecho, se desconoce el por qué la enfermedad arterioesclerótica evoluciona en unas ocasiones hacia la oclusión vascular y en otras hacia aneu-

rismia. Actualmente se considera el AAA como un proceso donde existe una interacción de factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista genético, el AAA es complejo al no seguir una herencia mendeliana simple y donde la suma de múltiples genes, cada uno de ellos interaccionando con factores ambientales, determinan en cada individuo el grado de susceptibilidad a padecer la enfermedad. En este contexto, desde 1977³³ se conoce que una historia positiva en familiares de primer grado de los pacientes con AAA aumenta el riesgo de padecerlo en 10 veces. En 1986, Johansen y Koepsell³⁴ compararon la historia familiar de 250 pacientes con AAA y 250 controles. Encontraron que el 19,2% de los pacientes manifestó tener un familiar de primer grado con historia de AAA, mientras que sólo el 2,4% de los controles lo tenía. Otros estudios han reportado una mayor prevalencia de AAA en hermanos de pacientes con AAA (4,4%) que en controles sanos (1,1%). Estos y otros estudios han demostrado la implicación de factores genéticos en la aparición y progresión de esta patología³⁵⁻⁴². Recientemente, en un estudio en gemelos, se ha reportado que la h^2 del AAA es del 71%⁴³.

Otros factores que favorecen la aparición de un AAA son los procesos inflamatorios e infecciosos de la pared aórtica, el consumo de tabaco, la insuficiencia respiratoria, determinadas uropatías y factores mecánicos que aumentan la tensión sobre la pared arterial, como la hipertensión. Por añadidura, algunos de estos factores de riesgo tienen su propia base genética.

La observación de procesos inflamatorios en la pared en los AAA es muy frecuente⁴⁴; éstos presentan diferencias sustanciales respecto a la aorta ateromatosa no aneurismática^{45,46}, como el predominio de linfocitos T en las aortas ateromatosas y de tipo T y B en las aneurismáticas, y la afectación constante de la adventicia en los AAA y sólo en fases muy avanzadas en la ateromatosis aórtica no aneurismática^{47,48}. Existen fundamentalmente dos procesos bioquímicos y celulares implicados en la dilatación aneurismática y su posterior ruptura: la proteólisis de la matriz extracelular (MEC) en la pared vascular y la apoptosis de las células musculares lisas (CML). La destrucción de la MEC provoca una pérdida de resistencia mecánica que favorece su posterior dilatación y posterior ruptura. En ambos procesos las proteasas desempeñan un papel central, ya que causan la degradación de la MEC e inducen anoikis en las CML⁴⁹. Las metaloproteinasas de la MEC (MMP) y sus inhibidores fisiológicos, los TIMP (*tissue inhibitors of metallo-proteinases*), constituyen una familia particularmente relevante. La MMP-9 parece especialmente importante en el desarrollo del AAA, aunque también se ha descrito la implicación de la MMP-1, 2, 3, 8, 10, 12 y 13. En las lesiones aneurismáticas también se ha observado la presencia de concentraciones elevadas de serina-proteasas, como la elastasa derivada de neutrófilos, así como cisteína-proteasas, implicadas en la degradación de la MEC y la anoikis de las CML⁵⁰⁻⁵⁴. No solo los leucocitos, sino que también las CML producen proteasas y representan la fuente principal de inhibidores de proteasas en la pared vascular. La interacción entre los leucocitos, fundamentalmente neutrófilos y macrófagos, y las células vasculares es crucial en estos procesos degradativos⁵⁵⁻⁵⁷. La autoinmunidad parece desempeñar un papel en la patogenia de esta enfermedad⁵⁸. Este es un punto importante para posibles desarrollos terapéuticos futuros,

pues abre un nuevo camino para la utilización de fármacos inmunomoduladores y antiinflamatorios, que podrían reducir el proceso inflamatorio y así detener el crecimiento de los aneurismas.

La neovascularización es un fenómeno íntimamente relacionado con la ruptura de los AAA⁵⁹; está mediada por factores pro-angiogénicos que incluyen, además de las MMP, quimioquinas y factores de crecimiento para las células endoteliales, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina (IL)-8 o la proteína 1 quimoatrayente para los monocitos (MCP-1), entre otros.

Los procesos infecciosos también están relacionados con los AAA. Tanaka et al⁶⁰ demostraron que en la pared de los aneurismas es más frecuente encontrar ADN del virus del herpes simple o del citomegalovirus que en la pared de la aorta normal. Por otra parte, la infección por *Chlamydia pneumoniae* se ha asociado con varias manifestaciones de la arteriosclerosis, entre ellas el AAA⁶¹.

Otros factores como el tabaquismo⁶², o la propia ateromatosis aórtica, se consideran contribuyentes a la génesis de los AAA, teniendo como factor común su participación en el debilitamiento de la pared de la aorta abdominal y su progresiva dilatación^{63,64}. El tabaco es, actualmente, el factor de riesgo conocido más importante. Así, la *odds ratio* de padecer AAA en fumadores con respecto a no fumadores es de 5,57 (intervalo de confianza del 95% 4,24-7,31). Además, la asociación entre el hábito de fumar y el AAA aumenta significativamente con el número de años que se ha sido fumador, y disminuye proporcionalmente al número de años en que se ha abandonado este hábito.

El origen multifactorial tan heterogéneo y su característica de enfermedad compleja con alta heredabilidad⁴³ es lo que ha movido a nuestro grupo a diseñar el estudio TAGA (*Abdominal Aorta Aneurysm Genetic Analysis: Triple-A Genetic Analysis*). Dicho proyecto, que está en estos momentos en su fase inicial de selección de familias y recolección de muestras, tiene como objetivo principal identificar las bases genéticas del AAA a través de la determinación de fenotipos intermedios potencialmente asociados al riesgo de sufrir AAA. Estos son parámetros ecográficos, antropométricos y plasmáticos, que incluyen mediadores de inflamación y de estrés oxidativo. Este estudio nos permitirá determinar en un futuro los individuos con mayor riesgo de padecer esta patología, para poder tratarlos de manera más precoz, y de ese modo retrasar su progresión y eventualmente disminuir la morbilidad derivada de una actuación quirúrgica, si ésta se realiza de manera programada en fases precoces de la enfermedad.

Conclusiones

Uno de los mayores retos para la biología en la era genómica es localizar los polimorfismos genéticos responsables de la variación en rasgos complejos de importancia médica. El estudio de las enfermedades complejas ha sufrido una evolución conceptual, que ha ido paralela a un gran desarrollo de las técnicas de Genética Molecular, y especialmente en los últimos años, a los avances en Estadística Genética y en computación, que han desarrollado métodos matemáticos cada vez más eficaces para la disección genética de rasgos cuantitativos complejos. Otro hito sin precedentes en la his-

toria de la ciencia ha sido la culminación del proyecto Genoma Humano, que conlleva enormes implicaciones en todos los campos de la Medicina, especialmente en el análisis de las enfermedades de base compleja.

El AAA tiene una base multifactorial compleja, donde múltiples interacciones entre factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, nuestros conocimientos sobre la base genética de esta patología son aún escasos. El gran reto actual es generar una lista de todos los factores genéticos que contribuyen a desarrollar AAA. Idealmente, esta lista ayudará a incrementar el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la enfermedad. La traslación de este conocimiento al ámbito asistencial producirá ventajas evidentes: mejorar la estrategia preventiva y terapéutica en los pacientes de riesgo e identificar familiares afectos, la mayoría de ellos asintomáticos, que de otra forma no podrían beneficiarse de la prevención.

Agradecimientos

Pedimos disculpas a los colegas cuyos trabajos no han sido citados directamente debido a las limitaciones de espacio. Agradecemos el apoyo del Fondo de Investigación Sanitaria (PI-08/ 0420 y PI-08/ 0756) de la Red Temática de Investigación Cardiovascular RECAVA-RD06/ 0014 del Instituto de Salud Carlos III, y muy especialmente de la Fundación de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Altmüller J, Palmer LJ, Fischer G, Scherb H, Wüst M. Genome-wide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet*. 2001;69:936-50.
- Almasy L, MacCluer JW. Association studies of vascular phenotypes. How and why? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22: 1055-7.
- Gambard G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*. 2000;355:308-11.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med*. 2002; 4:45-61.
- Almasy L, Blangero J. Multipoint quantitative trait linkage analysis in general pedigrees. *Am J Hum Genet*. 1998;62:1198-211.
- MacSweeney ST, Powell JT, Greenhalgh RM. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 1994;81:935-41.
- Patel MI, Hardman DT, Fisher CM, Appleberg M. Current views on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Am Coll Surg*. 1995;181:371-82.
- Halloran BG, Baxter BT. Pathogenesis of aneurysms. *Semin Vasc Surg*. 1995;8:85-92.
- Van der Vliet JA, Boll AP. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 1997;349:863-6.
- Vega de Ceniga M, Gómez R, Estallo L, de la Fuente N, Viviens B, Barba A. Analysis of expansion patterns in 4-4.9 cm abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 2008;22:37-44.

11. Rutledge R, Oller DW, Meyer AA, Johnson GJ Jr. A statewide, population-based time-series analysis of the outcome of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Ann Surg.* 1996;223:492-505.
12. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. *Eur J Surg.* 1992;158:19-23.
13. McFarlane M. The epidemiologic necropsy for abdominal aortic aneurysm. *JAMA.* 1991;265:2085-8.
14. Rantakokko V, Havia T, Inberg MV, Vänttinen E. Abdominal aortic aneurysms: a clinical and autopsy study of 408 patients. *Acta Chir Scand.* 1983;149:151-5.
15. Arnett TD, de Virgilio C, Donayre C, Grant E, Baker JD, White R. Abdominal aortic aneurysm screening in elderly males with atherosclerosis: the value of physical exam. *Am Surg.* 1996;62:861-4.
16. Estevan JM. Criterios actuales en el manejo de los AAA. En: Capdevila JM, editor. *Debates sobre Cirugía Vascular.* ICS; 1996. p. 77-83.
17. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2009;49:47-51.
18. Bengtsson H, Sonesson B, Länne T, Nilsson P, Solvig J, Loren I, et al. Prevalence of abdominal aortic aneurysm in the offspring of patients dying from aneurysm rupture. *Br J Surg.* 1992;79:1142-3.
19. Galland RB, Simmons MJ, Torrie EP. Prevalence of abdominal aortic aneurysm in patients with occlusive peripheral vascular disease. *Br J Surg.* 1991;78:1259-60.
20. MacSweeney ST, O'Meara M, Alexander C, O'Malley MK, Powell JT, Greenhalgh RM. High prevalence of unsuspected abdominal aortic aneurysm in patients with confirmed symptomatic peripheral or cerebral arterial disease. *Br J Surg.* 1993;80:582-4.
21. Wolf YG, Otis SM, Schwend RB, Bernstein EF. Screening for abdominal aortic aneurysms during lower extremity arterial evaluation in the vascular laboratory. *J Vasc Surg.* 1995;22:417-23.
22. Andersson A, Ellitsgaard N, Jorgensen B. Screening for abdominal aortic aneurysms in 295 outpatients with intermittent claudication. *Vasc Surg.* 1991;25:516-22.
23. Barba A, Estallo L, Rodríguez L, Baquer M, Vega de Céniga M. Detection of abdominal aortic aneurysm in patients with peripheral artery disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;30:504-8.
24. Carty GA, Nachtigal T, Magyar R, Herzler G, Bays R. Abdominal duplex ultrasound screening for occult aortic aneurysm during carotid arterial evaluation. *J Vasc Surg.* 1993;17:696-702.
25. Karanjia PN, Madden KP, Lobner S. Coexistence of abdominal aortic aneurysm in patients with carotid stenosis. *Stroke.* 1994;25:627-30.
26. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study, 1994-2001. *Circulation.* 2009;119:2202-8.
27. Simon G, Nordgren D, Connelly S, Shultz PJ. Screening for abdominal aortic aneurysms in a hypertensive patient population. *Arch Intern Med.* 1996;156:2081-4.
28. Hak E, Balm R, Eikelboom BC, Akkersdijk GJ, van der Graaf Y. Abdominal aortic aneurysm screening: an epidemiological point of view. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;11:270-8.
29. Pleumakers HJ, Hoes AW, van der Does E, van Urk H, Grobbee DE. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg.* 1994;8:119-28.
30. Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in The Cardiovascular Health Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:963-70.
31. Ward AS. Aortic aneurysmal disease. A generalized dilating diathesis. *Arch Surg.* 1992;127:990-1.
32. Tilson MD. Atherosclerosis and aneurysm disease. *J Vasc Surg.* 1990;12:371-2.
33. Clifton MA. Familial abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1977;64:765-6.
34. Johansen K, Koepsell T. Familial tendency for abdominal aortic aneurysms. *JAMA.* 1986;256:1934-6.
35. Powell JT, Greenhalgh RM. Multifactorial inheritance of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Surg.* 1987;1:29-31.
36. Tilson MD, Seashore MR. Fifty families with abdominal aortic aneurysms in two or more first-order relatives. *Am J Surg.* 1984;147:551-3.
37. Webster MW, St Jean PL, Steed DL, Ferrell RE, Majumder PP. Abdominal aortic aneurysm: results of a family study. *J Vasc Surg.* 1991;13:366-72.
38. Verloes A, Sakalihasan N, Koulier L, Limet R. Aneurysms of the abdominal aorta: familial and genetic aspects in three hundred thirteen pedigrees. *J Vasc Surg.* 1995;21:646-55.
39. Pasmussen TE, Hallett JW Jr, Metzger RL, Richardson DM, Harmsen WS, Goronzy JJ, et al. Genetic risk factors in inflammatory abdominal aortic aneurysms: polymorphic residue 70 in the HLA-DRB1 gene as a key genetic element. *J Vasc Surg.* 1997;25:356-64.
40. Powell J, Greenhalgh R. Genetic variation on chromosome 16 and the growth of abdominal aortic aneurysms. En: Yao JST, Pearce WH, editors. *Technologies in Vascular Surgery.* Philadelphia: WB Saunders Co.; 1992/02.
41. Lilienfield CE, Gunderson PD, Sprafka JM, Vargas C. Epidemiology of aortic aneurysms: a population based study. *Am J Epidemiol.* 1984;120:379.
42. Webster MW, Ferrel RE, St Jean PL, Majumder PP, Forgol SR, Steed DL. Ultrasound screening of first degree relatives of patients with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 1991;13:9-14.
43. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, Hultgren R, Swedenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* 2010; 51:3-8.
44. Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, Wang YP, Lynch TG, McManus BM. Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *J Vasc Surg.* 1994;19:797-803.
45. Webster MW, McAuley CE, Steed DL, Miller DD, Evans CH. Collagen stability and collagenolytic activity in the normal and aneurysmal human abdominal aorta. *Am J Surg.* 1991;161:635-8.
46. Gargiulo M, Stella A, Spina M, Faggioli G, Cenacchi G, Degani A, et al. Content and turnover of extracellular matrix protein in human "nonspecific" and inflammatory abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7:546-53.
47. Gertz SD, Kurgan A, Eisenberg D. Aneurysm of the rabbit common carotid artery induced by periarterial application of calcium chloride in vivo. *J Clin Invest.* 1988;81:649-56.
48. Menashi S, Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation. *J Vasc Surg.* 1987;6:578-82.
49. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:2146-54.
50. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:987-94.
51. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm. Pathogenesis and implications for management. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2605-13.
52. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;110:625-32.
53. Vorp DA, Vande Geest JP. Biomechanical determinants of abdominal aortic aneurysm rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1558-66.

54. Wills A, Thompson MM, Crowther M, Sayers RD, Bell PRF. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms-Cellular and biochemical mechanisms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;12:391-400.
55. Eliason JL, Hannawa KK, Alilawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2005;112: 232-40.
56. Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, et al. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104: 2855-60.
57. Tilson MD. The polymorphonuclear leukocyte and the abdominal aortic aneurysm. *Circulation.* 2005;112:154-6.
58. Tilson MD, Ozsvath K, Hirose H, Shichao X. A genetic basis for autoimmune manifestations in the abdominal aortic aneurysm resides in the MHC class II locus DR beta 1. *N Y Acad Sci.* 1996; 800:208-17.
59. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson RW, 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; 26:2077-82.
60. Tanaka S, Komori K, Okadome K, Sugimachi K, Mori R. Detection of active cytomegalovirus infection in inflammatory aortic aneurysms with RNA polymerase chain reaction. *J Vasc Surg.* 1994; 20:235-43.
61. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of *Chlamydia pneumoniae* in the vascular system and its possible implications. *J Clin Pathol.* 1996;49:102-6.
62. MacSweeney ST, Ellis M, Worrell PC, Greenhalgh RM, Powell JT. Smoking and growth rate of small abdominal aortic aneurysms. *Lancet.* 1994;344:651-2.
63. Thompson MM, Jones L, Nasim A, Sayers RD, Bell PR. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996;11:464-9.
64. Zarins CK, Glagov S, Vesselinovitch D, Wissler RW. Aneurysm formation in experimental atherosclerosis: relationship to plaque evolution. *J Vasc Surg.* 1990;12:246-56.