

ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA AORTA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB

FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Desarrollado por Laura Mora Boza

Estudio morfométrico de la aorta en ratas tratadas con sunitinib

Laura Mora Boza

**GRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**TRABAJO FIN DE GRADO EXPERIMENTAL EN
FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR**

Junio, 2018

Tutores: Dra. Carmen M. Vázquez Cueto y Dr. Alfonso Mate Barrero

Resumen

Uno de los fármacos utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores es el sunitinib. Esta molécula se encuentra dentro del grupo de los inhibidores de los receptores tirosin kinasa (RTKs). Entre los receptores donde ejerce su acción destacamos los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), unos receptores diana utilizados en multitud de estrategias antiangiogénicas en oncología.

Como todos los fármacos antineoplásicos, el sunitinib presenta efectos adversos, entre los cuales destaca la hipertensión arterial. Los mecanismos implicados en el desarrollo de la hipertensión arterial asociada al tratamiento con sunitinib no están del todo claros, y no se conoce en profundidad cuales son las razones por las cuales se produce este aumento de la presión arterial. Se postula que el sunitinib podría actuar produciendo una disfunción endotelial o la inhibición de la vía del óxido nítrico, dando lugar a dicho efecto adverso.

En este proyecto, basado en el estudio morfométrico de arterias aortas de ratas Wistar tratadas con sunitinib, se comprueban las evidencias científicas desarrolladas sobre el aumento de la presión arterial tras el tratamiento con este fármaco. Gracias a las tinciones con hematoxilina-eosina, podemos observar los cambios morfométricos que sufren las arterias de dichas ratas tratadas con sunitinib, mostrando un remodelado de las mismas con un aumento en el espesor de la capa media y en la relación media/lumen. Las conclusiones a las cuales se llegan en este trabajo pueden modificar la terapéutica llevada a cabo en estos pacientes, conduciendo a una mejora en la adherencia al tratamiento y, por supuesto, aumentando la calidad de vida de los mismos.

Palabras clave:

Sunitinib, hipertensión arterial, aorta, tinción hematoxilina-eosina, ratas Wistar.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Morfología e histología de la arteria aorta	1
1.2. La hipertensión arterial: remodelado vascular	3
1.3. Sunitinib	4
1.3.1. <i>Indicaciones terapéuticas</i>	4
1.3.2. <i>Propiedades farmacocinéticas</i>	5
1.3.3. <i>Mecanismo de acción</i>	5
1.3.4. <i>Reacciones adversas: hipertensión arterial</i>	7
2. Objetivos	8
3. Materiales y Métodos	9
3.1. Diseño experimental	9
3.1.1. <i>Animales de experimentación y tratamiento</i>	9
3.1.2. <i>Determinación de la presión arterial</i>	10
3.2. Obtención de las muestras de estudio	11
3.3. Procesado de tejidos	12
3.3.1. <i>Fijación</i>	12
3.3.2. <i>Deshidratación</i>	12
3.3.3. <i>Inclusión en parafina y formación de bloques</i>	13
3.4. Estudio histológico	14
3.4.1. <i>Desparafinado estándar</i>	14
3.4.2. <i>Tinción con hematoxilina y eosina</i>	15
3.5. Visualización de las muestras al microscopio y análisis estadísticos	16
4. Resultados y discusión	18
4.1. Características generales de los animales: presión arterial	18
4.2. Estudio histológico y morfométrico de la aorta	19
4.3. Discusión	20
5. Conclusiones	22
6. Bibliografía	22



1. Introducción

1.1 Morfología e histología de la arteria aorta

El sistema circulatorio posee la función de transportar por todo nuestro organismo los nutrientes necesarios (tales como aminoácidos y azúcares), metabolitos, electrolitos, gases y hormonas, entre otros, a las células del cuerpo. Una vez llevada a cabo dicha distribución, este sistema es el encargado de recoger los desechos metabólicos formados en las células, que se eliminarán por los riñones en la orina y por el aire exhalado en los pulmones, ricos en dióxido de carbono (CO₂). Este sistema está integrado por el sistema vascular sanguíneo, el corazón y el sistema vascular linfático (Menche, 2012).

El sistema cardiovascular humano está formado por el corazón, la sangre y los vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos son conductos musculares elásticos encargados de distribuir la sangre por todo el organismo, entre los cuales distinguimos las arterias, las venas y los capilares sanguíneos. Se denominan arterias a aquellos vasos sanguíneos que, partiendo desde el ventrículo izquierdo del corazón, desembocan en los distintos órganos corporales, a los cuales suministran sangre oxigenada mediante el intercambio gaseoso en los capilares sanguíneos (Shepherd y Vanhoutte, 1979)

Por ello, las arterias son vasos sanguíneos que van disminuyendo progresivamente de calibre a lo largo del trayecto sanguíneo, pero presentando una estructura común en su pared. En general, la pared de los vasos sanguíneos está formada por tres capas: túnica íntima, media y adventicia (Majesky et al., 2011), las cuales se describen en los siguientes párrafos (Figura 1).

La túnica íntima está presente en todos los vasos sanguíneos y su composición es idéntica en cada uno de ellos. Está compuesta por un endotelio (epitelio simple plano) con células de morfología poligonal, el cual descansa sobre una lámina basal. Además, presenta un subendotelio formado por fibroblastos y fibras de colágeno, además de fibras musculares lisas que forman la “lámina elástica interna”, la cual puede confundirse con las láminas de fibras elásticas de la túnica media. Los vasos sanguíneos del sistema cardiovascular se diferencian en función de la descripción histológica de las otras dos capas, la túnica media y la adventicia. En el caso de la aorta, la túnica íntima presenta un mayor grosor que el resto de arterias.

La túnica media está compuesta por fibras musculares lisas, las cuales se disponen de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno. En las arterias, la túnica media presenta un aspecto compacto y un espesor regular. En el caso de la aorta, es la capa más gruesa de las tres.

La túnica adventicia está formada por fibras de colágeno, formando un tejido conjuntivo laxo.

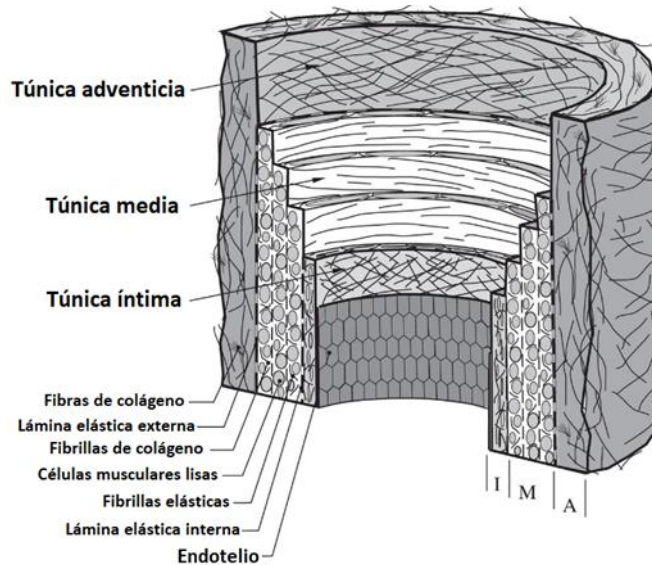


Figura 1. Representación esquemática de las distintas capas que presenta una arteria elástica. Tomada de Tsamis et al.

Los límites entre las tres capas se definen mediante una lámina elástica interna, que separa la íntima de la media, y una lámina elástica externa (casi imperceptible, ya que se confunde con las fibras elásticas de la túnica media) que separa la media de la adventicia.

Centrándonos en las arterias, éstas se diferencian en tres tipos (Guo-Wei et al., 2013):

- Las arterias elásticas, que son arterias conductoras de gran calibre. Éstas las encontramos en la aorta, tronco braquiocefálico, carótida, subclavia e ilíaca.
- Las arterias musculares, que son arterias con función de distribución. Éstas las podemos encontrar en la femoral, braquial y en las arterias que aparecen en el interior de los órganos.
- Las arteriolas, las cuales son vasos sanguíneos con un diámetro menor a 100 μm .

La arteria aorta es la principal arteria del cuerpo humano, que en individuos adultos presenta 2,5 cm de diámetro (Hagan et al., 2000). La aorta da origen al resto de arterias



del sistema circulatorio, exceptuando las arterias pulmonares, las cuales emergen del ventrículo derecho del corazón. La arteria aorta es el principal vaso del organismo encargado de distribuir la sangre expulsada de las cavidades ventriculares del corazón en cada sístole. Nace directamente del ventrículo izquierdo del corazón, y formando un arco llamado arco aórtico, desciende hacia el abdomen donde, se bifurca en dos arterias, las ilíacas comunes y la arteria sacra media. Macroscópicamente presenta un color amarillento con una pared delgada en relación a su diámetro.

1.2 La hipertensión arterial: remodelado vascular

Investigaciones recientes muestran un aumento en el promedio de la presión arterial en niños y adultos en los últimos 20 años (Cutler et al., 2008), de forma que la hipertensión arterial se está convirtiendo en uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, además de ser un factor de riesgo de mortalidad en todo el mundo (Ezzati et al., 2002).

Los cambios estructurales en los vasos sanguíneos, denominados de forma general como “remodelado”, se describen como un proceso de reordenamiento a efectos de comprender la patogénesis de la enfermedad y su enfoque terapéutico. Sin embargo, se ha discutido que el término “remodelado” no es el correcto, ya que se utiliza para describir cualquier cambio en la estructura de los vasos o el miocardio. Para evitar este error, algunos autores se basan en cuatro propuestas (Heagerty et al., 1993):

En primer lugar, el término “remodelado” debe limitarse a cambios en el diámetro de la luz de un vaso relajado, medido bajo una presión intravascular estándar.

En segundo lugar, distinguimos “remodelado eutrófico” (Figura 2 (b)), como aquel cambio que se produce en la pared vascular sin cambios en el diámetro del anillo. Este proceso puede distinguirse del “remodelado hipertrófico” (Figura 2 (c)), el cual implica un aumento del espesor de la túnica media y por ello, un aumento del ratio túnica media/lumen. A su vez, podemos diferenciar ambos conceptos del término “remodelado hipotrófico” (Figura 2 (a)), el cual implica una disminución en el espesor de la túnica media, aumentando por ello el área del lumen, y disminuyendo así la relación ratio túnica media/lumen.

En tercer lugar, los cambios que implican una disminución en el diámetro de la luz deberían calificarse como “remodelado hacia el interior” (Figura 2 (d)), y los que implican

un aumento del diámetro de la luz deberían calificarse como “remodelado hacia el exterior” (Figura 2 (e)).

En cuarto lugar, el proceso de remodelado se cuantifica mediante el término “índice de remodelado”, el cual hace referencia a la variación de luz atribuible al remodelado eutrófico, en función de los cambios de la sección del área de la pared.

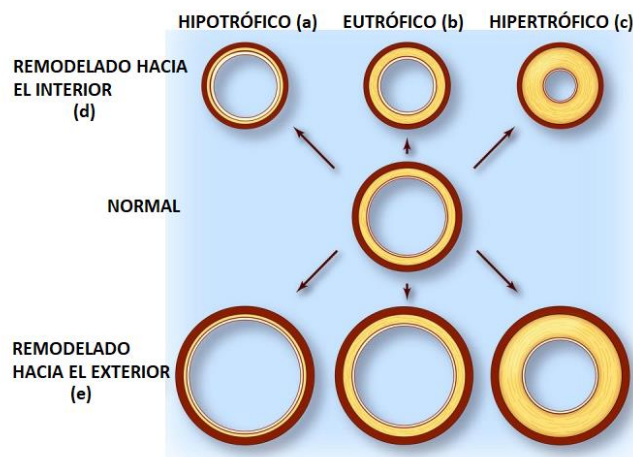


Figura 2. Representación esquemática de los tipos de remodelado vascular.

Tomada de Mulvany et al.

1.3 Sunitinib

1.3.1 Indicaciones terapéuticas

El sunitinib es un medicamento de diagnóstico hospitalario, administrado por vía oral para el tratamiento de múltiples tumores como el tumor del estroma gastrointestinal (GIST) tras fracaso terapéutico con Imatinib por resistencia o intolerancia (Demetri et al. 2006); el carcinoma de células renales avanzado (RCC) (Motzer et al., 2006); como tratamiento adyuvante de los pacientes con cáncer de colon y recto (CCR) recurrente después de la nefrectomía; y tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos progresivos bien diferenciados (pNET) en pacientes con enfermedad localmente avanzada o metastásica irresecable (Raymond et al., 2011). Además, dicho fármaco está siendo estudiado para el tratamiento de otros tumores como tumor de pulmón, de mama, de próstata y colorrectal (Novello et al., 2009), aunque aún no está autorizado su uso.

El tratamiento con dicho antineoplásico se basa en una terapia dirigida, la cual permita conocer características significativas en el funcionamiento de las células cancerosas que

no se encuentren presentes en las células normales. Así, se consigue disminuir los efectos adversos propios de los tratamientos antineoplásicos.

1.3.2 Propiedades farmacocinéticas

El sunitinib (Sutent®; Pzifer Inc., New York, EE.UU) está comercializado en forma de L-malato de sunitinib (Figura 3), y basándonos en su fórmula molecular se denomina como la sal (1:1) del ácido 2(S)-hidroxibutanodioico (ácido L-málico) con la N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida (Speed et al., 2016).

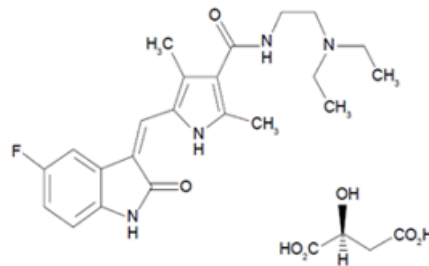


Figura 3. Estructura química del malato de sunitinib. Tomada de Hao y Sadek.

La biodisponibilidad del sunitinib no se ve afectada por la ingesta concomitante de alimentos, ya que su absorción se mantiene invariable tanto si es administrado en ayunas como si es administrados después de comidas. Al ser administrado por vía oral, se consigue una concentración máxima (C_{máx}) en sangre a las 6-12 horas post-ingesta. En cuanto a su metabolismo, el sunitinib se metaboliza principalmente gracias al citocromo P450 3A4 (CYP3A4) a su metabolito activo N-desetil (SU12662), siendo a su vez ambos metabolizados por dicho citocromo. Por ello, se debe evitar el consumo de drogas que puedan interferir al CYP3A, ya que debido a dicha interacción puede verse disminuida o aumentada la concentración plasmática del fármaco. Tanto el sunitinib como su metabolito, presentan una farmacocinética lineal y poseen vidas medias prolongadas de 40 y 110 horas respectivamente, siendo la principal vía de eliminación las heces en un 61%, y una excreción urinaria inferior al 16% (Hao et al., 2016)

1.3.3 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del sunitinib se basa en inhibir múltiples receptores tirosina kinasa (RTKs) (Aparicio-Gallego et al., 2011) presentes en las células implicados en el crecimiento tumoral, la angiogénesis patológica¹¹ y la progresión a metástasis del cáncer.

Por ello, esta molécula pertenece al grupo de los denominados inhibidores de tirosin kinasas (TKIs). Los receptores tirosin kinasa son proteínas transmembrana localizadas en la superficie celular caracterizadas por poseer dominios de unión a ligandos extracelulares y un dominio catalítico intracelular. Estos receptores son capaces de transducir señales extracelulares al citoplasma. Tras la unión con sus correspondientes ligandos, se promueve la dimerización del receptor, lo que provoca la autofosforilación de los dominios citoplasmáticos e inducción de la actividad tirosinkinasa, dando lugar a la estimulación de múltiples vías de señalización que modulan la síntesis del ADN, la división celular, así como el crecimiento, progresión, migración, diferenciación y muerte celular (Sun et al., 2016).

Estos receptores son fundamentales para el buen funcionamiento del organismo y deben encontrarse siempre en equilibrio, ya que la sobreexpresión o las mutaciones de estos receptores y/o de sus ligandos pueden provocar el desarrollo de neoplasias (Patyna et al., 2006).

Existen varios receptores que el sunitinib es capaz de inhibir (Figura 4). Dicha inhibición impide la unión intracelular del adenosín trifosfato (ATP) al dominio de tirosina de los receptores relacionados con los factores de crecimiento. Entre éstos destacamos los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α y PDGFR β), el receptor tirosina kinasa-3 tipo FSM (FTL3), los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), el receptor del factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1R), el receptor del factor de células madre (KIT) y el receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales (RET) (Lee y Motzer, 2015).

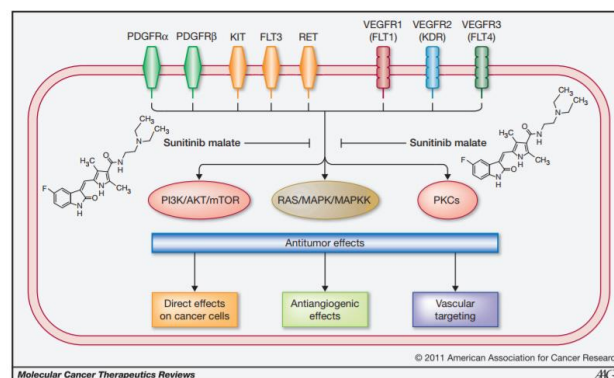


Figura 4. Receptores específicos inhibidos por sunitinib. Tomada de Aparicio-Gallego et al.



Debido a su capacidad para inhibir estos RTKs, se esperaba que el sunitinib exhibiera un beneficio dual para los pacientes: en primer lugar, por su actividad antitumoral directa frente a los tumores que expresan y dependen de una o más dianas para la proliferación y supervivencia de las células tumorales (p. ej., KIT y FLT3) y segundo lugar, por proporcionar una potente actividad antiangiogénica dirigida a VEGFR2 y PDGFR β) (Mendel et al., 2015).

1.3.4 Reacciones adversas: hipertensión arterial

Los inhibidores de los VEGFRs, como el sunitinib, se asocian con una mayor incidencia en diversas patologías cardiovasculares, incluida la hipertensión arterial, la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, la prolongación del intervalo QT, y el tromboembolismo. De todas ellas, la hipertensión arterial es la toxicidad que se da con una mayor frecuencia en los tratamientos con dichos inhibidores, un efecto que puede limitar el desarrollo del tratamiento contra el cáncer (Rhian et al., 2017).

Los mecanismos moleculares por los cuales se produce hipertensión arterial durante esta terapia no se conocen aún. Se han propuesto diversos mecanismos, entre los que podemos destacar los siguientes (George et al., 2012): disfunción endotelial, inhibición de la vía del óxido nítrico (NO, molécula con acción vasodilatadora), ligado a un aumento de la endotelina-1 (ET-1, potente vasoconstrictor liberado por el endotelio). En condiciones fisiológicas, el VEGF estimula la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), aumentando la producción de NO, favoreciendo la relajación vascular. Por ello, la inhibición de VEGFR promueve la disminución de la biodisponibilidad de NO, incrementando la concentración de ET-1, lo que a su vez induce mayor vasoconstricción con el consiguiente aumento de la presión arterial por incremento de la resistencia periférica. (Figura 5) (Nakai et al., 2017). Disminución de la densidad de la microvasculatura (rarefacción), a causa de la inhibición de la vía del NO, que incrementa la rigidez arterial. Estrés oxidativo, por la generación de especies reactivas de oxígeno, provocando un efecto vasoconstrictor. Cambios en el sistema renina-angiotensina-aldosterona y remodelado vascular.

Todo ello conduciendo a una disfunción endotelial que podría ser la causa de la hipertensión arterial desarrollada.

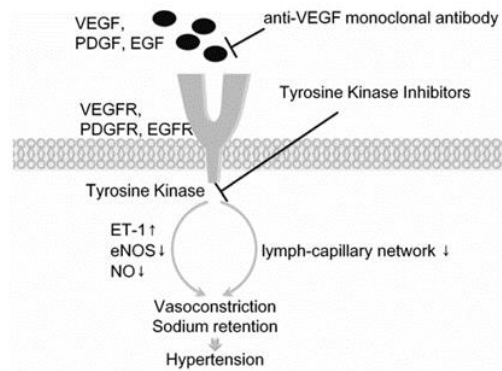


Figura 5. Esquema representativo de la hipertensión inducida por el tratamiento de inhibidores de la tirosin kinasa. Tomada de K. Nakai et al.

Algunos estudios indican a la hipertensión arterial como un biomarcador de la eficacia del tratamiento antineoplásico en personas con cáncer del estroma gastrointestinal RCC, mejorando la progresión del tumor y la supervivencia global de la población (George et al., 2017). Por todo ello, es importante en primer lugar conocer los mecanismos implicados en la hipertensión arterial producido por el sunitinib, para de esa forma no limitar su tratamiento antineoplásico, y en segundo lugar deben evaluarse las posibles interacciones que se produzcan entre el sunitinib y los tratamientos llevados a cabo para el control de dicha hipertensión, para asegurar la eficacia del tratamiento antineoplásico.

Además de la hipertensión arterial, se han observado otras reacciones adversas como consecuencia de la terapia con sunitinib, entre las que destacamos fatiga, astenia, diarrea, mucositis, estomatitis, náuseas, vómitos, disminución del apetito/anorexia, dolor abdominal, síndrome mano-pie, hemorragias, alteración del gusto/disgeusia, dispepsia, trombocitopenia, entre otros (Huston et al., 2008).

2. Objetivos

Una de las principales reacciones adversas producidas tras un tratamiento antineoplásico es la hipertensión arterial. Se han postulado diversas teorías que explican las causas de dicho aumento de presión arterial. En este estudio, se pretende dar a conocer los cambios morfométricos que se producen en la arteria aorta tras un tratamiento con el antineoplásico. Nuestra hipótesis de partida se basa en qué cambios morfométricos en la arteria aorta producidos como consecuencia del tratamiento con sunitinib pueden estar asociados al desarrollo de la hipertensión arterial observada. Para demostrar esta hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la aparición de hipertensión arterial producida por el sunitinib mediante la medida de las presiones arteriales sistólicas.
2. Estudiar desde un punto de vista histológico y morfométrico las aortas de ratas tratadas con sunitinib.

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

3.1.1 Animales de experimentación y tratamiento

Para la realización de esta memoria se ha llevado a cabo un estudio de tipo experimental en ratas macho de la raza Wistar, de 14-16 semanas de edad, con un peso entre 350-400 g y procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos:

- Grupo control (sin tratamiento con sunitinib): 6 ratas.
- Grupo sunitinib, tratadas con sunitinib a dosis de 25 mg/kg de peso corporal/día, de manera continua durante tres semanas, incluyendo dicho fármaco en la comida (Figura 6): 6 ratas.



Figura 6. Elaboración de la comida donde se incorporaba el tratamiento

Los animales de experimentación se han mantenido en el estabulario de la Facultad de Farmacia, en condiciones estandarizadas de temperatura y luminosidad ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 horas luz/12 h oscuridad), con libre acceso al agua de bebida y alimentadas con pienso (en caso del grupo sunitinib, éste va introducido en el mismo). Además, desde el inicio del tratamiento y hasta el día del sacrificio se ha medido semanalmente el peso corporal y la cantidad de pienso ingerido, para poder ajustar los correspondientes tratamientos a las dosis indicadas. Todos los procedimientos llevados a cabo cumplen con la normativa

vigente (internacional, nacional y autonómica) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos⁽¹⁾.

3.1.2 Determinación de la presión arterial

Durante todo este proceso experimental, se ha llevado a cabo un seguimiento semanal de la presión arterial sistólica y de la frecuencia cardíaca de las ratas en tratamiento y de las ratas control. Para ello, contamos con un medidor de presión NIPREM 645 (CIBERTEC, España) que emplea un ciclo automático de inflado-desinflado de presión y registro de datos, y cuenta con un software integrado para el procesamiento y representación de los mismos (Figura 7). Es importante remarcar que medimos únicamente la presión arterial sistólica, ya que la medida de la presión arterial diastólica no es fiable mediante el uso de este sistema.

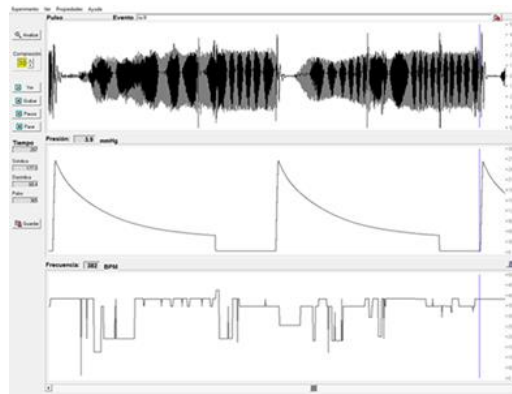


Figura 7. Ejemplo de registro de presión arterial con el sistema NIPREM 645.

La metodología llevada a cabo para la medida de la presión arterial se basa en un método indirecto de oclusión de la cola. En primer lugar, el animal se introduce en unos cepos cilíndricos de tal forma que quedan inmovilizados, y se les aísla de cualquier estímulo externo durante unos 5 min. Transcurrido este tiempo, se les coloca la cola debajo de una lámpara de infrarrojos durante unos 10-15 min (tapándola con intención de que no se quemé). Con ello, conseguiremos una vasodilatación de la arteria y los pulsos cardíacos que detectemos sean lo más precisos posibles. Tras este tiempo, desconectamos la luz de infrarrojos y nos disponemos a colocar el manguito presurizador y el transductor de pulsos cardíacos en la cola del animal. A continuación, se aumenta la presión del manguito colapsando completamente la arteria caudal. En este momento, la señal del pulso queda

⁽¹⁾ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 (DOUE núm. L 276 de 20 de octubre). Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (BOE núm. 34 de 8 de febrero). Decreto 80/2011 de 12 de abril (BOJA núm. 82 de 28 de abril).

atenuada completamente. El momento en el que aparece de nuevo el pulso es cuando la presión del manguito iguala a la presión sistólica de la rata.

Los valores de presión arterial sistólica de cada rata se han calculado a partir de la media aritmética de 3-4 mediciones sucesivas, evitando en la medida de lo posible crear situaciones de estrés en el animal durante el proceso (Figura 8).



Figura 8. Dispositivos para la toma de presión arterial

3.2 Obtención de las muestras de estudio

Transcurridas las tres semanas de tratamiento, se procede al sacrificio de los animales para la extracción de la aorta (órgano objeto de nuestro estudio). Los animales, se anestesian con hidrato de cloral al 6% en cantidades dependientes del peso del animal en ese momento. Se suministran 0,5 mL de anestésico por cada 100 mg de peso de la rata, vía intraperitoneal (para no dañar ningún órgano y no se forme una burbuja que impida que la anestesia difunda por todo el organismo). Para confirmar que está anestesiada, se aprietan las patas y se observa que no se produce ningún movimiento.

A continuación, antes de proceder a la extirpación de la aorta (Figura 9), se recogen 4 mL de sangre, obtenidos mediante punción cardiaca directa con agujas de calibre 0,26x25 mm (23G). Esto permite limpiar lo mejor posible la zona de sangre consiguiendo así una mayor visualización del interior del organismo.

Una vez extraída la sangre, se procede a la extirpación de la aorta con previo aislamiento del corazón y pulmones. Tras separar la aorta del resto de tejidos, ésta se lava con suero fisiológico frío (solución de NaCl al 0,9% p/v a 4°C) y se limpia de los restos de grasa que presente a su alrededor. A continuación, el tejido sufre un proceso de preparación para su estudio microscópico que se describe detalladamente en la sección 3.3.



Figura 9. Extirpación de aorta en ratas Wistar tratadas con sunitinib

3.3 Procesado de tejidos

Una vez obtenido el tejido del animal, para poder llevar a cabo un estudio basado en microscopía, es necesario mantener en la medida de lo posible dicho órgano intacto en todo momento hasta su posterior manipulación. La aorta se somete a una serie de procesos de fijación, deshidratación e inclusión en parafina, que detallaremos en mayor medida en los siguientes apartados.

3.3.1 Fijación

Con intención de mantener la estructura del tejido intacta en todo momento, se somete el mismo a una fijación, de tal manera que se puedan preservar las estructuras microscópicas de las diferentes células que conforman el tejido para su posterior estudio. Los aldehídos (más concretamente el formaldehído) son los fijadores más utilizados. Para llevar a cabo el proceso de fijación, la aorta se corta en anillos de 3-4 mm aproximadamente y se sumerge en formaldehído al 4% en PBS⁽²⁾ durante 24 horas en una noria rotativa de agitación (GP70, *Selecta*). Transcurrido este tiempo, se introduce cada sección de aorta dentro de un cassette (Figura 10), donde se mantendrá durante el resto del procesado.

3.3.2 Deshidratación

El siguiente paso de este proceso se basa en sustituir el agua que presenta el tejido por parafina, es decir, deshidratar la muestra. Para ello, se sumerge el tejido en diferentes cubetas que presentan diluciones con concentraciones crecientes de etanol. En primer

² Buffer fosfato salino (conocido también por sus siglas en inglés, PBS, de *phosphate buffered saline*).

lugar, se sumerge en etanol al 70% durante 12 horas, y tras esto se sumerge secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de etanol 80%, 90% y 100%, durante una hora cada uno (Figura 10).

3.3.3 Inclusión en parafina

Una vez se obtiene el tejido deshidratado, se procede a la inclusión de este en parafina, de tal manera que podamos obtener un bloque sólido el cual se procederá después a cortar. Para ello, procedemos previamente al tratamiento con etanol:xilol (1:1) durante 2 horas y, a continuación, con xilol puro durante 3 horas. El xilol es un disolvente orgánico que permite que la parafina caliente difunda hacia el interior de los tejidos de forma homogénea. A continuación, se sumerge el tejido en una mezcla de xilol:parafina (1:1), a 60°C durante 2 horas. Por último, el órgano se mantiene toda la noche en parafina pura a 60°C. Al día siguiente se utiliza parafina limpia para formar los bloques con la ayuda de los cassettes y utilizando un molde metálico (Figura 10). Los bloques se enfrían a 4°C durante 1-2 horas para solidificar la parafina y, tras desmontarlos de los cassettes, se mantienen a temperatura ambiente hasta el día de su corte, para que estén lo más sólidos posible.

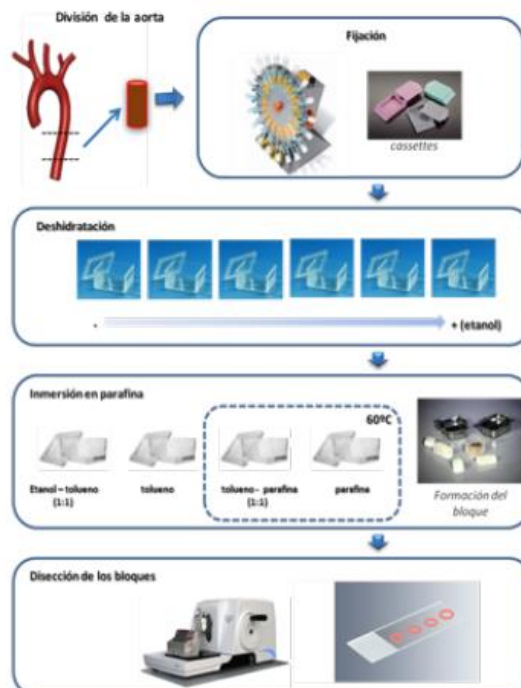


Figura 10. Esquema representativo de los procesos de fijación, deshidratación e inmersión en parafina.

3.4 Estudio histológico

Una vez obtenidos los bloques de aorta, se procede a realizar unos cortes para dividir la muestra en secciones y poder estudiarla al microscopio. Esto se lleva a cabo con un micrótopo (MR-2258, Histo-line laboratorios) (Figura 11). El grosor de las secciones depende del uso que se vaya a hacer de las mismas. En nuestro caso, el grosor que se busca es de 3 μm , grosor que se considera el óptimo para su posterior análisis morfométrico. En primer lugar, desbastamos el bloque con intención de retirar la mayor cantidad de parafina sobrante del mismo y facilitar por tanto la visión del tejido al cortar. Tras el desbastado, procedemos a cortar el bloque de tal forma que obtengamos anillos de aorta lo más redondos posibles. Estas secciones de la aorta obtenidas con el micrótopo se depositan sobre agua destilada a 54°C en un baño donde, aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, el calor las extiende sin llegar a su punto de fusión. Una vez tengamos la parafina transparente, procedemos a recoger las muestras con un portaobjetos. Éstos se dejan a temperatura ambiente toda la noche, de tal manera que podamos eliminar burbujas que se hayan formado durante el proceso de recolección de los cortes. Tras este tiempo, guardamos las muestras en una caja contenedora de portaobjetos para su posterior procesado. Se pretenden recoger 3-4 secciones de anillos de aorta por cada portaobjeto.



Figura 11. Dispositivo MR-2258, Histo-line laboratorios

3.4.1 Desparafinado estándar

Antes de comenzar con la tinción, hay que eliminar la parafina que rodea e impregna el tejido y reponer en su lugar el agua extraída durante el procesado. Para ello, se somete al tejido a un proceso de desparafinado y rehidratación de los portaobjetos, con ayuda de una serie de reactivos (Figura 12), según el esquema siguiente:

- Xilol I 7 min
- Xilol II 7 min
- Etanol:xilol (1:1) 5 min
- Etanol 100% 5 min
- Etanol 90% 5 min
- Etanol 80% 5 min
- Etanol 70% 5 min
- Agua corriente 5 min



Figura 12. Materiales para la realización del desparafinado de las muestras.

3.4.2 Tinción con hematoxilina y eosina

La hematoxilina-eosina es la coloración utilizada de forma rutinaria en histología para ver la mayoría de los tejidos, cuando solo se quieren observar sus características, mediante la utilización de un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina). Por afinidad química elemental, la hematoxilina, básica, se va a unir a componentes ácidos de la célula que están presentes fundamentalmente en el núcleo, y la eosina, que es ácida, a componentes básicos, los cuales aparecen ocupando la mayor parte del citoplasma. El contraste entre uno y otro colorante nos va a dar una idea general del estado del órgano.

Una vez tengamos todos los portaobjetos sumergidos en agua corriente, procedemos a la tinción con hematoxilina la cual se encuentra en frío en la nevera, durante 1 min. A continuación, los introducimos de nuevo en agua corriente, dejándolos bajo el grifo durante 10 min, de tal manera que eliminemos el exceso de hematoxilina de los portaobjetos.

Pasado este tiempo, procedemos a la tinción con eosina, dejándola actuar durante 15 min. Posteriormente, introducimos los portaobjetos en etanol al 100% durante 5 min, xilol I

durante 7 min y xilol II durante otros 7 min, eliminando así el exceso de eosina que se encuentre en las muestras.

Por último, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (Neo-Mount®), con la ayuda de una pinza plana para microscopía. Las preparaciones se colocan en posición horizontal sobre una bandeja realizando una leve presión sobre el cubreobjetos, para evitar la formación de burbujas. Como resultado, este tipo de tinción permite visualizar los núcleos celulares de un color azul oscuro y el citoplasma de un tono rosáceo.

3.5 Visualización de las muestras al microscopio y análisis estadísticos

Una vez obtenida una batería de muestras teñidas, se proceden a visualizar con un microscopio Zeiss (Figura 13) ligado al software Spot Beta, con el cual seleccionamos las imágenes de las aortas de cada grupo experimental que se encuentren en mejor estado para su posterior estudio.

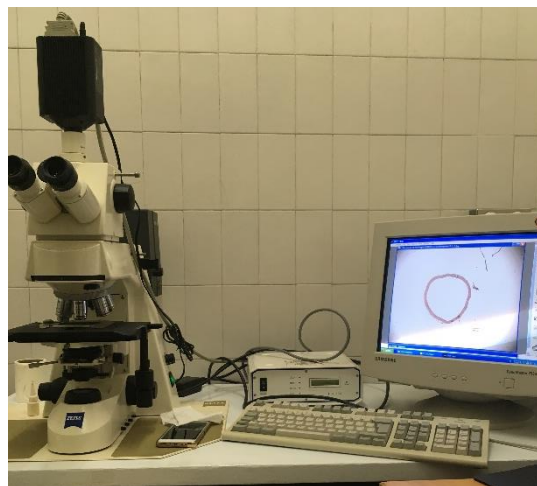


Figura 13. Microscopio Zeiss conectado al software Spot Beta. Captura de imágenes de los diferentes cortes de las aortas para su posterior análisis.

Dichas imágenes se procesan con ayuda del software ImageJ (Figura 14), con el cual conseguimos calcular el área del lumen, área de la túnica media, ratio túnica media/lumen y espesor de cada uno de los anillos estudiados, tanto en los grupos control como en los grupos de ratas que han recibido el tratamiento con sunitinib. Los resultados comparativos de cada grupo se muestran más detalladamente en la sección 4.2.

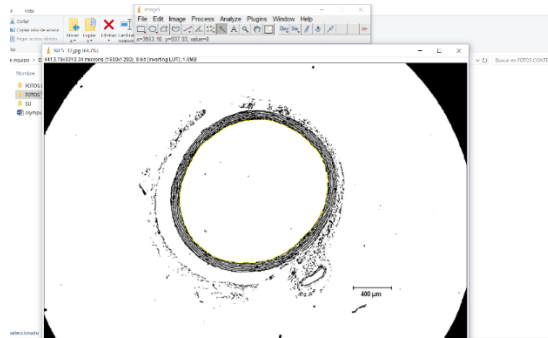


Figura 14. Software ImageJ. Cálculo del área del lumen, túnica media, ratio media/lumen y espesor de los diferentes anillos seleccionados.

Los datos numéricos obtenidos posteriormente se analizan con ayuda del software GraphPad, el cual nos permite calcular los valores estadísticos necesarios para su posterior representación gráfica (Figura 15).

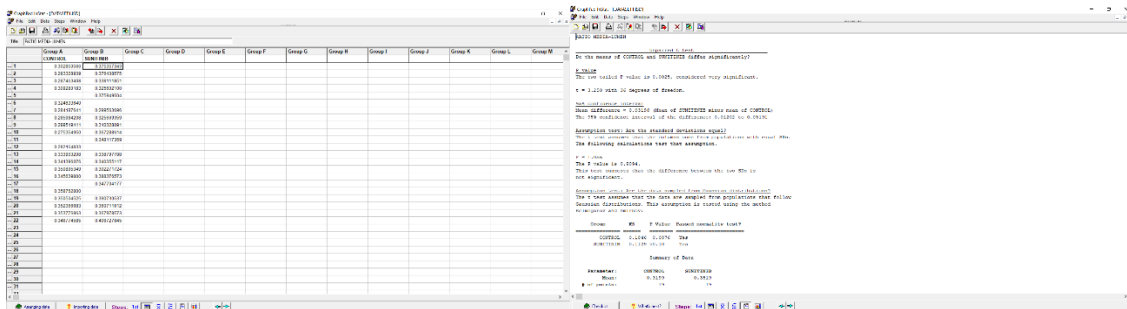


Figura 15. Software GraphPad. Cálculos estadísticos de los resultados obtenidos de las diferentes área y espesor.

La comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ha realizado mediante el estudio estadístico por pares aplicando el test de Turkey, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$.

Una vez obtenidos los resultados matemáticos que permiten visualizar el proceso experimental que han sufrido las aortas de las ratas, se seleccionaron dos anillos, uno procedente de una rata control y otro procedente de una rata que ha recibido el tratamiento con sunitinib, y con ayuda de un microscopio Olympus BX40 (Figura 16) conectado al software cellSens, se procede a captar imágenes a 10x de las aortas de dichos grupos experimentales.



Figura 16. Microscopio Olympus BX40 Series.

4. Resultados y discusión

4.1 Características generales de los animales: presión arterial

La Figura 17 muestra los resultados de los valores promedio de presión arterial sistólica (PAS) entre los dos grupos experimentales de animales, una vez transcurrido el periodo de experimentación. Tal como se indica, los valores correspondientes a la presión arterial sistólica son significativamente mayores en el grupo que recibió la terapia con sunitinib ($152 \pm 0,8$ mmHg) al comparar los valores con los obtenidos en el grupo control ($134 \pm 0,6$ mmHg).

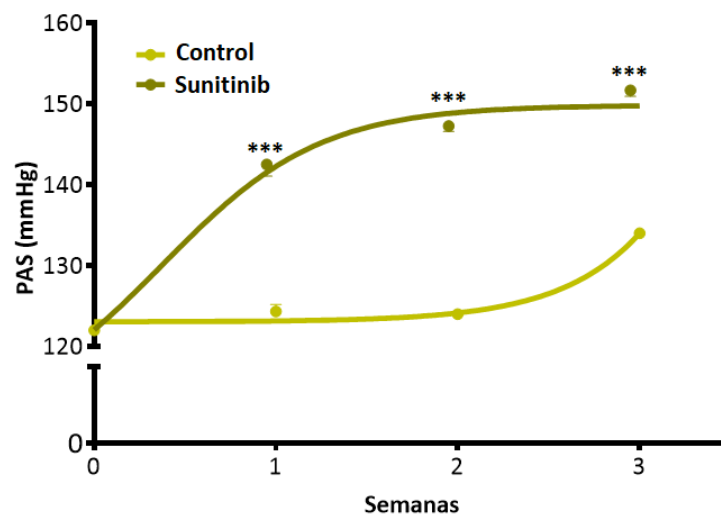


Figura 17. Valores de PAS finales en los dos grupos experimentales de animales. Presión arterial sistólica (PAS) en ratas que han recibido una dieta normal (Control), y ratas tratadas con sunitinib (Sunitinib). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mmHg), y representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con grupo control.

4.2 Estudio histológico y morfométrico de la aorta

Las micrografías de la figura 18 (A-B) corresponden a cortes de aortas representativas de los dos grupos experimentales de animales teñidos con hematoxilina-eosina para la realización de los estudios morfométricos. Como puede observarse, en la imagen correspondiente a la rata tratada con sunitinib (Figura 18-B), se muestra un engrosamiento de la túnica media con respecto a la imagen observada en las ratas controles (Figura 18-A).

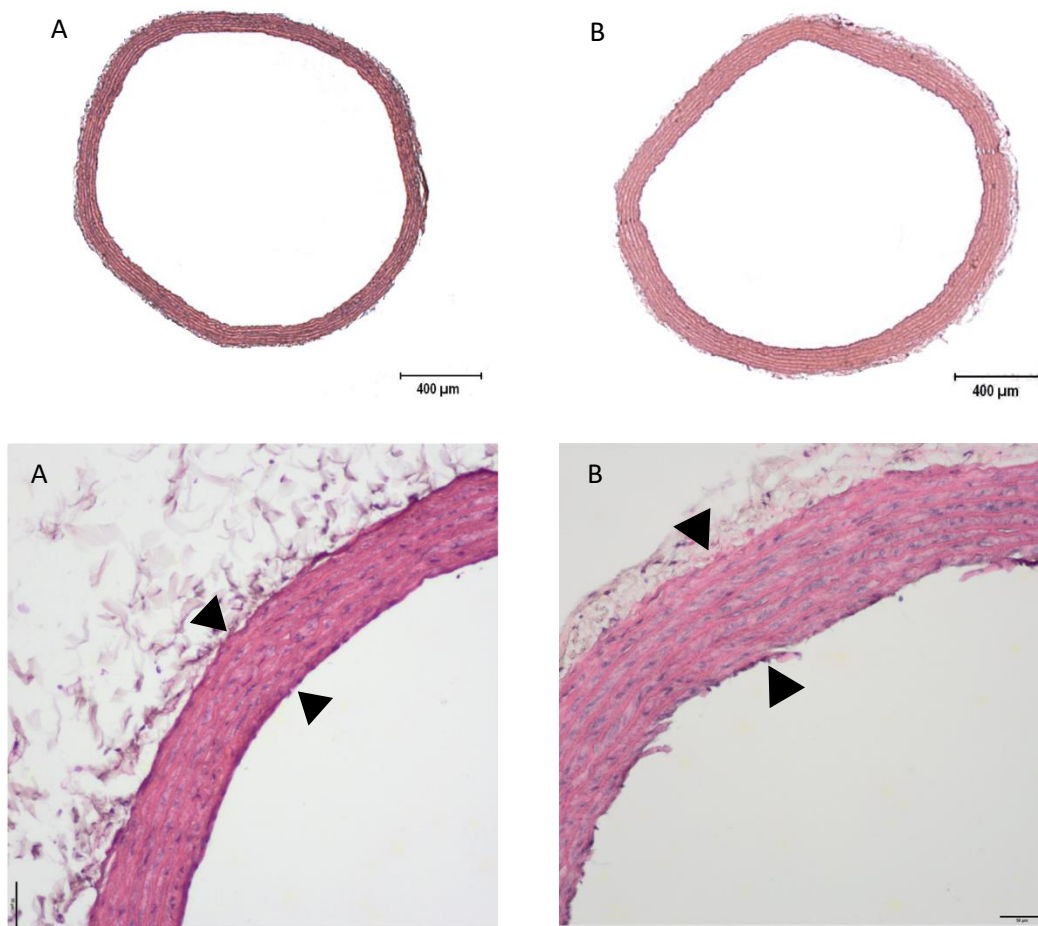


Figura 18. Tinción hematoxilina-eosina. Ratas que han recibido una dieta normal (control) (A), y ratas tratadas con sunitinib (B). Las flechas (\blacktriangle , \blacktriangledown) delimitan la túnica media. Barras: 400 μm y 50 μm .

Este engrosamiento da lugar a un aumento significativo en el espesor de la túnica media (Figura 19-C), así como al área (Figura 19-D) y ratio media/lumen (Figura 19-F), en las ratas tratadas con sunitinib respecto a las ratas controles. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el área del lumen entre las ratas controles y aquellas tratadas con sunitinib (Figura 19-E).

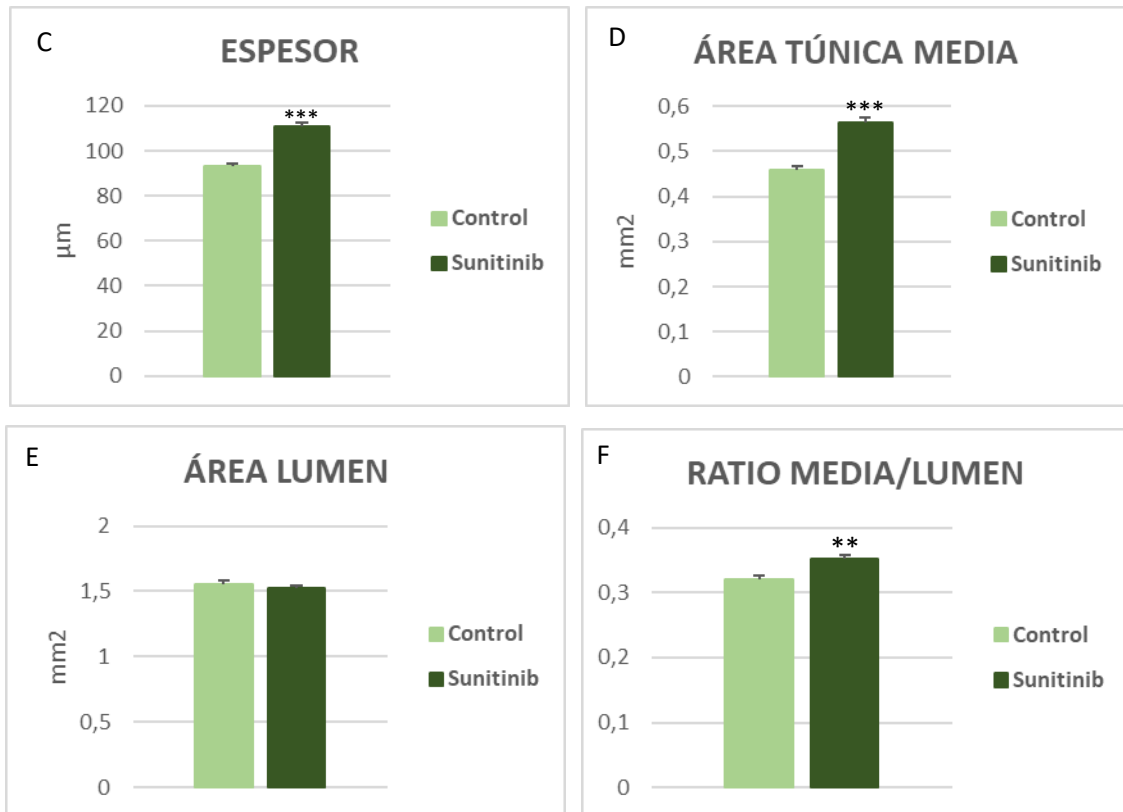


Figura 19. Estudio morfométrico de las aortas. (C) Espesor de la túnica media expresado en micras, (D) área de la túnica media expresado en milímetros cuadrados, (E) área del lumen expresado en milímetros cuadrados, (F) ratio media/lumen. (C-F) Los valores de las gráficas representan la media \pm S.E.M de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ comparado con control.

4.3 Discusión

Las terapias anticancerígenas basadas en fármacos como el sunitinib (Hansen et al., 2017), cuyo mecanismo de acción se fundamenta en la inhibición del VEGFR, presentan como principal efecto adverso la hipertensión arterial. Basándonos en ello, durante 3 semanas se han estudiado ratas tratadas con sunitinib, con el fin de determinar cómo éste afecta al sistema vascular.

En neoplasias renales y gastrointestinales, donde la pauta posológica del sunitinib es más común, este fármaco se administra durante 4 semanas de tratamiento seguidas de 2 semanas de descanso, con el fin de paliar los efectos nocivos derivados del mismo. En nuestro estudio sólo fueron necesarias 3 semanas para conseguir elevar significativamente los valores de presión arterial sistólica, como puede observarse en otros estudios (León-Mateos et al., 2015).



Las cifras de presión arterial sistólica aumentaron en las ratas tratadas con sunitinib al compararlas con los valores observados en ratas controles. Estos resultados muestran la capacidad hipertensiva del fármaco.

Durante el estudio morfométrico de las aortas con las tinciones de hematoxilina-eosina en las ratas tratadas con sunitinib, hemos podido comprobar un aumento en el engrosamiento y área de la túnica media y en el ratio media/lumen, en comparación con las ratas controles que no han recibido tratamiento. Basándonos en varios estudios (Jae-Sun et al., 2014), el aumento del área de la túnica media de la aorta supone un proceso patológico posterior y un remodelado vascular de la arteria. Esto podría agravar la hipertensión y causar un daño en el órgano afectado incluyendo una hipertrofia ventricular izquierda.

Varios autores muestran cómo el aumento del espesor de la arteria en respuesta al tratamiento con sunitinib podría preceder a la aparición de la hipertensión arterial. Se piensa que un importante mecanismo por el cual el sunitinib induce hipertensión arterial está relacionado con la disminución en la producción de óxido nítrico en las paredes de las arterias. Además, la inhibición de los factores de crecimiento endotelial vascular podría causar un incremento de la resistencia vascular sistémica y la rarefacción vascular, llevando a un incremento del espesor arterial. Por tanto, este aumento podría preceder a la aparición de la hipertensión arterial a causa del tratamiento con sunitinib (Hishashi et al., 2009).

Las enfermedades cardiovasculares se consideran el principal problema que afecta a la vida de la población, especialmente la hipertensión arterial (Cutler et al., 2008). De acuerdo con varios estudios (Hui et al., 2012), se demuestra que el principal cambio que se produce en arterias de gran calibre en presencia de hipertensión es un “remodelado hipertrófico hacia el exterior”. Esto se puede contrastar con nuestros resultados, ya que se observa claramente un aumento del espesor en ratas tratadas con sunitinib en comparación con el espesor de las ratas que no han recibido el tratamiento.

Actualmente, las causas exactas de la hipertensión inducida por VEGFI y la cardiotoxicidad siguen sin estar claras, aunque los avances en el campo han indicado el papel potencial de la vasoconstricción, disfunción renal y rarefacción. Se necesita urgentemente más investigación para entender completamente los mecanismos moleculares por los cuales la inhibición de la señalización de VEGF induce daño



cardiovascular, con la esperanza de conseguir evitar la hipertensión arterial sin afectar negativamente a los efectos terapéuticos de VEGFI (Touyz et al., 2017).

A la hora de seleccionar un tratamiento quimioterápico óptimo para un paciente, se debe tener en cuenta el espectro de complicaciones vasculares asociadas con dicho fármaco y su comorbilidad. Sin embargo, la evaluación del beneficio neto actualmente está pobremente definida, ya que no se ha visto el papel que presenta el endotelio en la fisiopatología de los mecanismos que sustenta la toxicidad vascular. Los pacientes se han beneficiado enormemente de los avances en cáncer y terapias cardiovasculares, y ahora el desafío está en acercar las disciplinas clínicas y de investigación, que trabajen en colaboración para garantizar un buen tratamiento oncológico sin daño cardiovascular (Cameron et al., 2016).

5. Conclusiones

1. La presión arterial sistólica aumenta significativamente en las ratas sometidas a un tratamiento continuo de sunitinib durante tres semanas.
2. El desarrollo de hipertensión arterial observado podría deberse en parte al remodelado vascular observado en las aortas de estos animales.

6. Bibliografía

1. Aparicio-Gallego G, Blanco M, Figueroa A, García-Campelo R, Valladares-Ayerbes M, Grande-Pulido E et al. New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(12):2215-2223.
2. Atkins M, Jones CA, Kirkpatrick P. Sunitinib malate. *Nature Rev Drug Discov.* 2006; 5: 279-280.
3. Baeyens N, Nicoli S, Coon BG, Ross TD, Van den Dries K., Han, J et al. Vascular remodeling is governed by a VEGFR3-dependent fluid shear stress set point. *Elife.* 2015.
4. Basu P, Qipshidze N, Sen U, Givvimani S, Munjal C, Paras K et al. Chronic hyperhomocysteinemia causes vascular remodeling by instigating vein phenotype in artery. *Arch Physiol Biochem.* 2011; 117(5): 270-282.
5. Baumbach G.L, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension.* 1989; 13 (6 Pt 2):968-972.



6. **Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, Cobleigh MA, Woldd AC, Eisenberg Pd et al.** Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol.* 2008; 26(11):1810-1816.
7. **Cameron AC, Touyz RM, Lang NN.** Vascular complications of cancer chemotherapy. *Can J Cardiol.* 2016; 32(7):852-862.
8. **Chow LQM, Eckhardt SG.** Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol.* 2007; 25(7):884-896.
9. **Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ.** Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988–1994 and 1999–2004. *Hypertension.* 2008; 52(5):818–827.
10. **De Wildt DJ, de Jong Y, Hillen FC, Steerenberg PA, van Hoesel QG.** Cardiovascular effects of foxorubicin-induced toxicity in the intact Lou/M Wsl rat in isolated heart preparations. *J Pharmacol Exp Ther.* 1985; 235:234-40.
11. **Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Sha MH, Verweij J et al.** Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: A randomised controlled trial. *Lancet.* 2006; 368(9544):1329-1338.
12. **Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ.** Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet.* 2002; 360(9343):1347–1360.
13. **George S, Reichardt P, Lechner T, Li S, Cohen DP, Demetri GD.** Hypertension as a potential biomarker of efficacy in patients with gastrointestinal stromal tumor treated with sunitinib. *Ann Oncol.* 2012; 23(12):3180-7.
14. **Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, Bruckman D, Karavite DJ, Russman PL et al.** The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA.* 2000; 283(7):897–903
15. **Hansen CR, Grimm D, Bauer J, Wehland M, Magnusson NE.** Effects and side effects of using Sorafenib and Sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(2):461.



16. **Hao Z, Sadek I.** Sunitinib: the antiangiogenic effects and beyond. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5495–5505.
17. **He GW.** Arterial grafts: clinical classification and pharmacological management. *Ann Cardiothorac Surg.* 2013; 2(4):507-518.
18. **Heagerty, AM, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ.** Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993; 21(4):391-397.
19. **Hisashi M, Soichi S, Takashi H, Hiroyuki O, Michio I, Koji M, Naohisa et al.** Early detection of hypertension in a patient treated with sunitinib by measuring cardio-ankle vascular index. *Tohoku J Exp Med.* 2009; 218, 115-119.
20. **Houk BE, Bello CL, Kang D, Amantea M.** A population pharmacokinetic meta-analysis of Sunitinib Malate (SU11248) and its primary metabolite (SU12662) in healthy volunteers and oncology patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15(7): 2497-2506.
21. **Hui Chen, Jun Yin, Yanpin Deng, Min Yang, Ligling Xu, Fukang Teng et al.** The protective effects of ginsenoside Rg1 against hypertension target-organ damage in spontaneously hypertensive rats. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12:53.
22. **Hutson TE, Figlin RA, Kuhn JG, Motzer RJ.** Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: An overview of toxicity and dosing strategies. *Oncologist.* 2008; 13(10):1084-1096.
23. **Jae-Sun Uhm, Woo-Baek Chung, Jung-Sook Yoon, Yong-Seog Oh, Ho-Joon Yoon.** Effects of adriamycin and candesartan on the collagen and elastin of the aorta in rats. *Clin Hypertens.* 2014, 20:8.
24. **Kim TS, Youn HJ.** From hypertension to heart failure. *Korean Hypertension J.* 2009; 15:1-11.
25. **Kontovinis LF, Papazisis KT, Touplikioti P, Andreadis C, Mouratidou D, Kortsaris AH.** Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: Clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. *BMC Cancer.* 2009; 9:82.



26. **Lee CH, Motzer RJ.** Sunitinib as a paradigm for tyrosine kinase inhibitor development for renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2015; 33:275–279.
27. **León-Mateos L, Mosquera J, Aparicio LA.** Treatment of sunitinib-induced hypertension in solid tumor by nitric oxide donors. *Redox Biol.* 2015; 6:421–425.
28. **Majesky MW, Dong XR, Hognlund V, Daum G, Mahoney WM.** The Adventitia: A Progenitor Cell Niche for the Vessel Wall. *Cells Tissues Organs.* 2011; 195(1-2):73–81.
29. **Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M et al.** Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013; 31(7):1281-357.
30. **Menche N.** *Biologie Anatomie Physiologie.* (ed) Munich: Elsevier; 2012.
31. **Mendel DB, Cherrington JM, Laird AD.** Determining a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for sunitinib. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(11): 2415–7.
32. **Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA et al.** Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24(1):16-24.
33. **Nakai K, Fujii H, Kono K, Goto S, Nishi S.** Hypertension Induced by Tyrosine-Kinase Inhibitors for the Treatment of Renal Cell Carcinoma in Hemodialysis Patients: A Single-Center Experience and Review of the Literature. *Ther Apher Dial.* 2017; 21(4):320-325.
34. **Novello S, Scagliotti GV, Rosell R, Socinski MA, Brahmer J, Atkins J et al.** Phase II study of continuous daily sunitinib dosing in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101(9):1543-1548.
35. **Patyna S, Laird AD, Mendel DB, O'Farrell AM, Liang C, Guan H et al.** SU14813: A novel multiple receptor tyrosine kinase 2nhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. *Mol cancer Ther.* 2006; 5(7):1774-1782.



36. **Raymond E, Dahan L, Raoul JL, MD, PhD, Yung-Jue Bang et al.** Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2011; 364(6):501-513.
37. **Saltz LB, Rosen LS, Marshall JL, Belt RJ, Hurwitz HI, Eckhardt SG et al.** Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *J Clin Oncol.* 2007; 25(30):4793-4799.
38. **Schmid TA, Gore ME.** Sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol.* 2016; 8(6): 348–371.
39. **Shepherd J, Vanhoutte P.** The Human Cardiovascular System. Facts and Concepts. *J Anat.* 1980; 132(Pt 3):437.
40. **Shurkla S, Robey RW, Bates SE, Ambudkar SV.** Sunitinib (Sutent, SU11248), a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, blocks function of the ATP-Binding Cassette (ABC) transporters p-glycoprotein (ABCB1) and ABCG2. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37(2):359–365.
41. **Socinski MA, Novello S, Brahmer JR, Rosell R, Sanchez JM, Belani CP et al.** The current status and evolving role of sunitinib in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008; 26(4):650-5
42. **Speed B, Bu HZ, Pool WF, Peng GW, Wu EY, Patyna S et al.** Pharmacokinetics, distribution, and metabolism of [14C]Sunitinib in rats, monkeys, and humans. *Drug Metab Dispos.* 2012; 40(3):539-555.
43. **Sun B, Zhao X, Ding L, Meng X, Song S, Wu S.** Sunitinib as salvage treatment including potent anti-tumor activity in carcinomatous ulcers for patients with multidrug-resistant metastatic breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2016; 7(36):57894–57902.
44. **Totzeck M, Mincu RI, Mrotzek S, Schadendorf D, Rassaf T.** Cardiovascular diseases in patients receiving small molecules with anti-vascular endothelial growth factor activity: A meta-analysis of approximately 29,000 cancer patients. *Eur J Prev Cardiol.* 2018; 25(5):482-494.
45. **Touyz RM, Lang NN, Herrmann J, van den Meiracker AH, Jan Danser AH.** Recent Advances in Hypertension and Cardiovascular Toxicities With Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition. *Hypertension.* 2017; 70:220-226.



46. **Tsamis A, Krawiec JT, Vorp DA.** Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *J R Soc Interface.* 2013; 10(83):20121004.
47. **Vilela-Martin JF, Vaz-de-Melo RO, Kuniyoshi CH, Abdo AN, Yugar-Toledo JC.** Hypertensive crisis: clinical-epidemiological profile. *Hypertens Res.* 2011; 34(3):367-371.
48. **Witte J, Lampe J, Koenen A, Urbaneck I, Steinbach A, Rettig R et al.** The role of distal tubule and collecting duct sodium reabsorption in sunitinib-induced hypertension. *Journal of Hypertension.* 2017; 36(4):892-903.
49. **Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S.** Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2009; 48(1):9–17
50. **Zurita AJ, Shore ND, Kozloff MF et al.** Distinct patterns of PSA modulation by single-agent sunitinib before combination with docetaxel and prednisone in patients with metastatic castrateresistant prostate cancer (CRPCa). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2007; 25:5134.