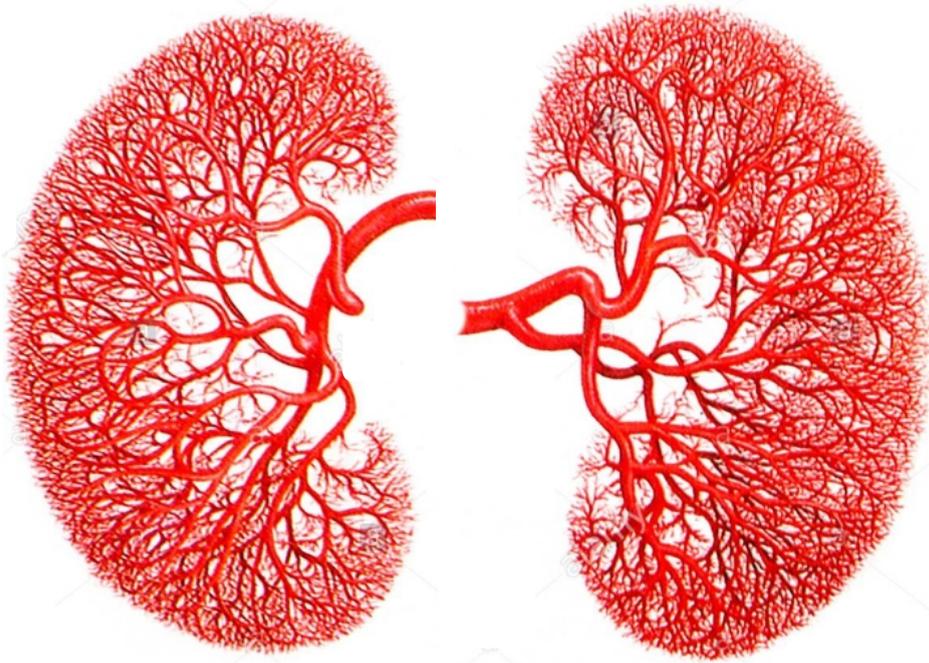


# EL EFECTO NEFROTÓXICO DEL SUNITINIB



**TRABAJO FIN DE GRADO EXPERIMENTAL**

**Manuela Alba Gutiérrez**

FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



# EL EFECTO NEFROTÓXICO DEL SUNITINIB

**Manuela Alba Gutiérrez**

FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**TRABAJO FIN DE GRADO DE CARÁCTER EXPERIMENTAL  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**Línea de investigación: Fisiopatología Cardiovascular**

**Tiempo de ejecución: Septiembre 2018-Julio 2019**



## RESUMEN

El sunitinib (Su) es un fármaco antineoplásico, dirigido al tratamiento en primera línea de pacientes con carcinoma de células renales metastásicas (CCRm). Dicho fármaco se encuentra dentro de los denominados inhibidores de los receptores de tirosina kinasa (RTKs), de los cuales destaca el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR); dicho factor desempeña un papel clave en la angiogénesis y en el establecimiento de la homeostasis vascular, siendo por tanto una diana clave en oncología. No obstante, la inhibición de las vías de señalización dependientes de Su da lugar a la aparición de distintos efectos adversos, destacando el desarrollo de hipertensión arterial (HTA) y el efecto nefrotóxico asociado al tratamiento, posiblemente vinculado al incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el riñón, aunque los mecanismos implicados en ambas patologías no están del todo claros. Varios autores describen diversos efectos secundarios a nivel renal como consecuencia del tratamiento con inhibidores de RTKs. Aunque se desconocen los mecanismos que subyacen al efecto nefrotóxico, hay evidencias de que el aumento de la actividad de la enzima NADPH oxidasa (NOX) juega un papel clave, pudiendo desencadenar un estrés oxidativo y por tanto una disfunción en el riñón.

En este proyecto basado en el efecto nefrotóxico del Su en ratas Wistar tratadas durante 3 semanas con el fármaco, se confirma el aumento de la presión arterial, sin cambios en la frecuencia cardíaca. Tras la determinación de la actividad NADPH oxidasa mediante quimioluminiscencia y la posterior caracterización de la fuente de anión superóxido ( $O_2^-$ ), podemos concluir que, en nuestras condiciones experimentales, la actividad local de la enzima NADPH oxidasa no parece estar implicada en el efecto nefrotóxico inducido por el tratamiento con Su, aunque sí podría conducir a una disfunción mitocondrial.

Como conclusión, se necesita conocer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la HTA y en el efecto nefrotóxico inducido por los RTKs, con la finalidad de reducir los efectos secundarios, mejorar la calidad de vida del paciente y avanzar en la búsqueda de nuevas terapias oncológicas más eficientes.

**Palabras clave:** Sunitinib, NADPH oxidasa, hipertensión arterial, daño renal.

**Ilustración de la portada:** Red de capilares derivados de divisiones de una arteria renal. Tomada de Science photo library. Autor: Alfred Pasioka.

## ABREVIATURAS

**ATP:** Trifosfato de adenosina.

**CCRm:** Carcinoma de células renales metastásicas.

**CSF-1R:** Receptor del factor estimulante 1 de colonias.

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial.

**ET-1:** Endotelina-1.

**FC:** Frecuencia cardíaca.

**FLT3:** Receptor tirosina quinasa 3 similar a FMS.

**GIST:** Tumores de estroma gastrointestinal.

**GTPasa:** Guanosina trifosfatasa.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno.

**HTA:** Hipertensión arterial.

**KIT:** Receptor del factor de crecimiento de células madre.

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

**NO:** Óxido nítrico.

**NOX:** NADPH oxidasa.

**Nrf-2:** Factor nuclear derivado del eritroide 2.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Anión superóxido.

**OH<sup>•</sup>:** Radical hidroxilo.

**ONOO<sup>-</sup>:** Anión peroxinitrito.

**OXI:** Oxipurinol.

**PAS:** Presión arterial sistólica.

**PBS:** Tampón fosfato salino.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PDGFR:** Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

**PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa.

**PLC:** Fosfolipasa C.

**RET:** Receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**ROT:** Rotenona.

**RTK:** Receptor de tirosina quinasa.

**Su:** Sunitinib.

**TGF- $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante- $\alpha$ .

**TKI:** Inhibidor del receptor de tirosina quinasa.

**URL:** Unidades relativas de luz.

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular.

**VEGFR:** Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

**VHL:** Gen von Hippel-Lindau.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Sunitinib</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 Generalidades e indicaciones terapéuticas.....	4
1.1.2 Receptores de tirosina kinasa y mecanismo de acción del Sunitinib .....	4
1.1.3 Toxicidad y efectos adversos .....	6
<b>1.2 Estrés oxidativo</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Generalidades .....	7
1.2.2 La NADPH oxidasa y su papel en el daño cardiovascular y renal.....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 Diseño experimental</b> .....	<b>9</b>
3.1.1 Animales de experimentación y tratamiento .....	9
3.1.2 Determinación de la presión arterial.....	10
<b>3.2 Obtención y procesado de muestras de estudio</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3 Actividad de la enzima NADPH oxidasa</b> .....	<b>13</b>
3.3.1 Homogeneización de tejidos .....	13
3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas .....	14
3.3.3 Determinación de la actividad NADPH oxidasa y caracterización de la fuente de anión superóxido en corteza renal .....	15
3.3.4 Análisis estadísticos .....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 Características de los animales de experimentación</b> .....	<b>17</b>
4.1.1 Peso renal y su relación con el peso corporal .....	17
<b>4.2 Presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca</b> .....	<b>18</b>
<b>4.3 Actividad NADPH oxidasa y caracterización de la fuente de anión superóxido en corteza renal</b> .....	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>25</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Sunitinib.

#### 1.1.1 Generalidades e indicaciones terapéuticas.

El sunitinib (Su) o SU11248 (SUTENT<sup>®</sup>, Pfizer Inc., Nueva York, NY, EE. UU.) es un fármaco antitumoral administrado por vía oral. Fue aprobado en 2006 por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA) (Schmid and Gore 2016; Shukla et al. 2009) como tratamiento de primera línea frente al carcinoma de células renales metastásicas (CCRm), siendo este el tipo de cáncer renal más frecuente en adultos, y también para tumores de estroma gastrointestinal (GIST), tras la progresión del tumor o la posible intolerancia al tratamiento con imatinib (Blasi et al. 2012; Hansen et al. 2017; Ishii et al. 2013; Del Puerto-Nevado et al. 2014; Scartozzi et al. 2013). Además, se ha demostrado el uso de Su en otras neoplasias malignas; así, se ha probado su actividad antineoplásica en tumores neuroendocrinos pancreáticos avanzados (Faivre et al. 2017; Mendel, Cherrington, and Laird 2015), frente a úlceras carcinomatosas en pacientes que presentan cáncer de mama metastásico, reduciéndose la lesión tumoral (Sun et al. 2016), en líneas celulares de carcinoma de tiroides (Dong et al. 2006) y en carcinoma de pulmón avanzado (Novello et al. 2009). También se demostró *in vitro* su efecto apoptótico en células de glioblastoma. Aunque todavía el uso del fármaco no está autorizado, se ha demostrado su importancia en el tratamiento para el tumor cerebral y otros carcinomas (Sanchez et al. 2013). Actualmente, se está investigando el uso de Su como terapia neoadyuvante, con la finalidad de poder reducir el volumen del tumor en las primeras fases y facilitar la intervención quirúrgica (Hansen et al. 2017; Noronha et al. 2016), o para pacientes con alto riesgo de recurrencia de carcinoma renal tras la nefrectomía (Lenis et al. 2018), demostrándose una mejora en la supervivencia de los pacientes que tomaban Su en comparación con los que tomaban placebo, a pesar de los efectos adversos del fármaco (Ravaud et al. 2016).

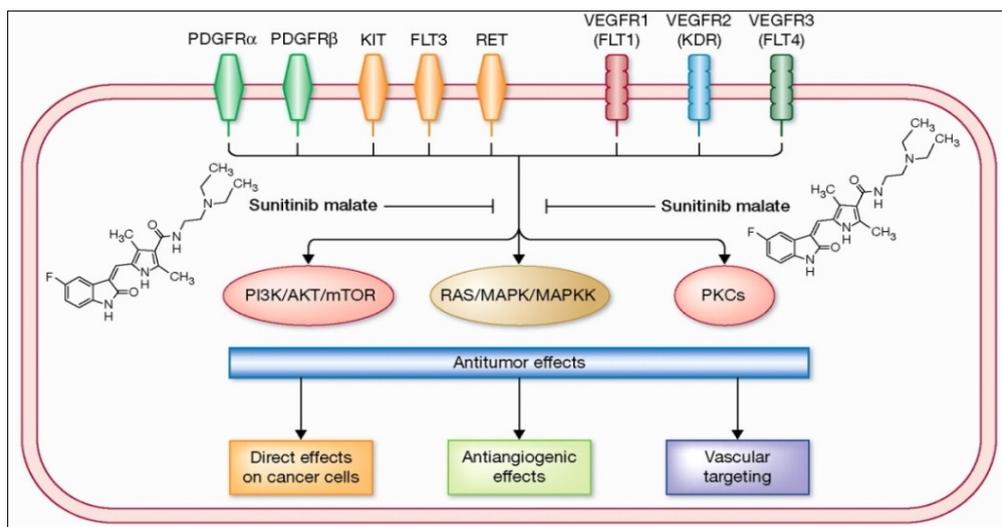
#### 1.1.2 Receptores de tirosina kinasa y mecanismo de acción del Sunitinib.

La función antineoplásica del Su radica en la capacidad de inhibir de forma selectiva a receptores de tirosina kinasa (RTKs), donde se incluyen los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1 VEGFR2 y VEGFR3), del factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGFR  $\alpha$  y PDGFR  $\beta$ ), del factor de crecimiento de células madre (KIT), del factor 1 estimulante de colonias (CSF-1R), el receptor tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), y el receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (RET). Estos RTKs están asociados a las vías de señalización que dan lugar a la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y a la proliferación celular (Blasi et al. 2012; Hansen et al. 2017; Ishii et al. 2013; Motzer et al. 2007; Scartozzi et al. 2013).

Uno de los genes que juegan un papel clave en el control de la homeostasis celular es el gen *von Hippel-Lindau (VHL)*, que codifica para la proteína reguladora p-VHL supresora de tumores. La función de dicha proteína es regular la transcripción del PDGF- $\beta$ , del VEGF y del factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). Este gen se inactiva por mutaciones en las células tumorales renales hasta en un 80% de los casos, dando lugar a una proteína inactiva. Como consecuencia de esto, se produce la sobreexpresión de los factores VEGF, PDGF- $\beta$  y TGF- $\alpha$ , activando de forma constitutiva a los RTKs afines, promoviendo la angiogénesis, la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la metástasis (Hansen et al. 2017; Motzer et al. 2007; Schmid and Gore 2016; Yang et al. 2003). Los RTKs son proteínas transmembranas, que presentan un dominio extracelular de unión a ligando específico, una hélice transmembrana y un dominio intracelular kinasa catalítico. En este dominio intracelular, se localiza una hendidura de unión a trifosfato de adenosina (ATP). Tras la unión del ligando al dominio extracelular, el receptor dimeriza y autofosforila de forma cruzada a los dominios intracelulares de tirosina C-terminal adquiriendo la actividad catalítica tirosina quinasa, promoviendo múltiples vías de señalización implicadas en la carcinogénesis (Qin et al. 2019; Shukla et al. 2009).

El Su, como inhibidor de los receptores de tirosina kinasa (TKI), es un fármaco compuesto por pequeñas moléculas que compiten con el ATP por la unión al dominio intracelular de los receptores (Aparicio-Gallego et al. 2011; Sanchez et al. 2013). Por tanto, al inhibirse la actividad de los RTKs se interrumpe la activación de la cascada de fosforilación citoplasmática en múltiples vías de señalización como Ras, Raf, MEK, ERK, PI3K y PLC, (señaladas algunas en la Figura 1) evitando la proliferación de las células neoplásicas y la estabilización del tejido de sostén que las nutre (Aparicio-Gallego et al. 2011; Hansen et al. 2017; Noronha et al. 2016).



**Figura 1. Receptores específicos inhibidos por Su y vías de señalización relacionadas.** Tomada de Aparicio-Gallego et al., 2011.

### 1.1.3. Toxicidad y efectos adversos.

Aunque el Su está diseñado para inhibir de forma específica a los RTKs, puede presentar efectos en otras kinasas, desencadenando múltiples efectos secundarios y exponiendo a los pacientes a toxicidades (Aparicio-Gallego et al. 2011). El efecto adverso más destacado es la aparición de hipertensión arterial (HTA), siendo un biomarcador de la eficacia del tratamiento (Rautiola et al. 2016); esto conduce a una disfunción del ventrículo izquierdo e insuficiencia cardíaca a largo plazo (Carter, Fretwell, and Woolard 2017).

El VEGF tiene una función vasodilatadora, modulando el tono vascular y regulando la homeostasis de la presión arterial. Está demostrado que el tratamiento antiangiogénico dirigido contra el VEGFR en pacientes con cáncer provoca el desarrollo de HTA, al igual que ocurre con otros fármacos inhibidores de RTKs como sorafenib y bevacizumab (Blasi et al. 2012). El VEGF actúa aumentando la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la síntesis de óxido nítrico (NO) (molécula vasodilatadora), favoreciendo la relajación de las células musculares lisas del vaso sanguíneo con la consiguiente vasodilatación. Tras la inhibición de VEGFR, se reduce la síntesis de NO en los vasos, lo que provoca un incremento en la resistencia periférica total y en la presión arterial (Hao and Sadek 2016) desencadenando en una toxicidad cardiovascular (Touyz et al. 2017).

Por todo esto, antes de comenzar el tratamiento de un fármaco antiangiogénico se debe

evaluar los factores de riesgo cardiovasculares y monitorizar la presión arterial durante el tratamiento, pudiéndose interrumpir la terapia en el caso de desarrollar HTA (de Jesus-Gonzalez et al. 2012).

Otros efectos adversos descritos del Su son fatiga, astenia, náuseas, diarrea, vómitos, dispepsia, dolor abdominal, estomatitis, estreñimiento, erupción, síndrome mano-pie, decoloración de la piel, alopecia, anorexia y sangrado leve (Hao and Sadek 2016). Con respecto a la disfunción renal asociada al tratamiento con Su se desconoce la etiología, aunque se ha descrito un deterioro renal en distintos estudios realizados en pacientes con carcinoma renal durante el tratamiento. Se ha demostrado que el Su induce un incremento significativo de la creatinina en comparación con pacientes no tratados, siendo un marcador de insuficiencia renal (Zhu, Stergiopoulos, and Wu 2009). Se han confirmado histológicamente lesiones a nivel de los glomérulos renales, engrosamiento capilar (Costero et al. 2010) y una reducción en la tasa de filtración glomerular (Ishihara et al. 2017). La inhibición de VEGF podría desencadenar una disminución en la densidad de vasos, promoviendo una desregulación endotelial y una disfunción en las células glomerulares, asociado con el óxido nítrico, causando una toxicidad renal directa (Zhu, Stergiopoulos, and Wu 2009). Además se ha demostrado en modelos animales, que VEGF-A juega un papel importante estableciendo la barrera de filtración renal y su desregulación da lugar a distintas enfermedades renales (Eremina et al. 2003) En consecuencia, la función renal debe controlarse durante el tratamiento de Su (Ishihara et al. 2017).

## **1.2. Estrés oxidativo.**

### 1.2.1 Generalidades.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre los mecanismos prooxidantes generadores de radicales libres y las defensas enzimáticas y no enzimáticas antioxidantes. La mayoría de los radicales libres, engloban las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que destacan: el hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entre otras moléculas. Estas moléculas actúan como segundos mensajeros en señalización celular, sin embargo, presentan una elevada reactividad, por lo que un desbalance en su generación, origina la oxidación de múltiples biomoléculas, desencadenando un estrés

oxidativo, que conduce a diversos daños celulares (Ozsurekci and Aykac 2016).

### 1.2.2 La NADPH oxidasa y su papel en el daño cardiovascular y renal.

Muchos estudios han demostrado la relación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos celulares por los cuales las ROS promueven un remodelado vascular y con ello un incremento de la HTA, están relacionados con vías sensibles a reacciones de oxidación-reducción y el estrés oxidativo (Montezano and Touyz 2012). Las ROS se originan a partir de diversas fuentes, siendo la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (NOX) la principal enzima en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Incalza et al. 2018) y además su sobreexpresión está relacionada con la mayoría de los carcinomas (Gautam et al. 2017).

La NOX está formada por un complejo con varias subunidades. Consta de componentes catalíticos (gp91phox y p22phox), diversas moléculas reguladoras (p47phox, p67phox y GTPase Rac1) y varias isoformas (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2) que difieren según el tejido y su ubicación en este (Brandes 2010; Gautam et al. 2017). La NOX cataliza la reacción de reducción del  $O_2$  dando como producto  $O_2^-$  o  $H_2O_2$ , utilizando NADPH como donador de electrones (Incalza et al. 2018), siendo esta enzima la principal responsable de la generación de ROS (Schröder et al. 2012). Estos productos son marcadores moleculares de estrés oxidativo y se han vinculado con la disfunción endotelial y el desarrollo de HTA en numerosos estudios (Brandt et al. 2018; Montezano and Touyz 2012). Además esta enzima parece tener un papel crítico en el desarrollo de enfermedades renales, e incluso podría contribuir al desarrollo de la HTA. Se piensa que la activación de las NOX renales podrían reducir la tasa de filtración glomerular (Brandes 2010). La generación de ROS de forma mantenida, da lugar a un estrés oxidativo mitocondrial, incrementando los radicales libres, originando un daño glomerular y una alteración de la barrera de filtración, desencadenando múltiples efectos renales (Ratliff et al. 2016).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo, es estudiar el estrés oxidativo y el papel de la enzima NADPH oxidasa renal en el efecto nefrotóxico inducido por el tratamiento con Su. Se evaluará los cambios en la presión arterial, la frecuencia cardiaca y la actividad de la enzima NADPH

oxidasa como fuente de ROS en el riñón.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1 Diseño experimental.**

##### **3.1.1 Animales de experimentación y tratamiento.**

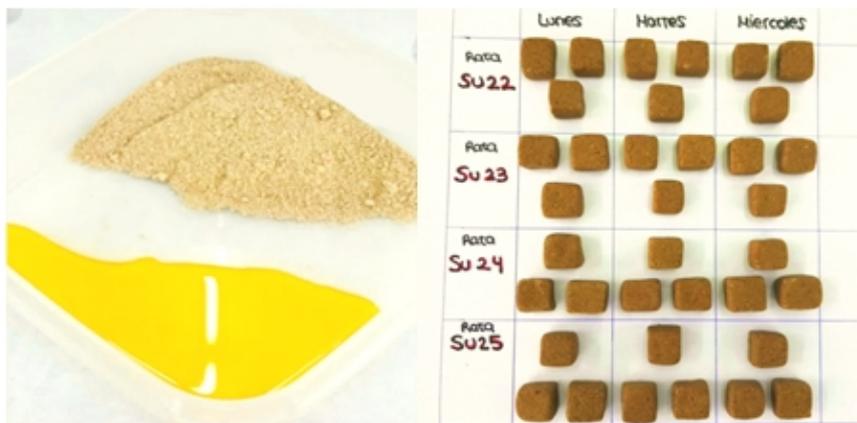
Para la realización de este estudio experimental, se han empleado ratas macho de la cepa *Wistar*, de edades comprendidas entre 10 y 12 semanas de edad y con un peso entre 260-300 g. Las ratas proceden del centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, y llegaron con 8 semanas de edad. Uno de los parámetros a monitorizar en este diseño experimental, es la presión arterial sistólica y la frecuencia cardiaca del animal, por lo que antes de empezar el tratamiento, se efectuaron una serie de medidas para comprobar que las ratas eran normotensas. Cabe destacar que todos los procedimientos cumplen con la normativa vigente a nivel internacional, nacional y autonómica relativa a la protección de animales utilizados en experimentación<sup>1</sup>.

Los animales se dividieron de forma aleatoria en dos grupos de 6 ratas cada uno:

- A. Grupo control. Animales alimentados con una dieta base estándar (Panlab, S.L.)
- B. Ratas en tratamiento (Grupo experimental Su). Los animales fueron tratados con una dosis de 25mg de Su / Kg peso corporal /día, durante 3 semanas.

Para la administración de Su, el fármaco se disolvió en agua y se incorporó de forma homogénea en el pellet de pienso comercial (dieta base estándar) una vez triturado. Posteriormente se repartió en porciones listas para ser administradas a las ratas del grupo experimental (Figura 2).

<sup>1</sup> 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).



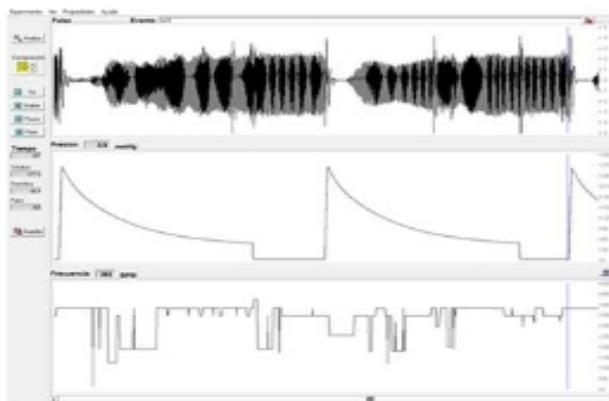
**Figura 2. Preparación de comida con tratamiento para el grupo experimental Su.**

Durante el experimento, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura y luz ( $23 \pm 1$  °C, con ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad) permaneciendo en el estabulario de la Facultad de Farmacia. Las ratas controles se alimentaron *ad libitum* con el pellet de pienso comercial, mientras que a las ratas en tratamiento se les administró el pellet de forma controlada, asegurando la correcta dosificación del fármaco y previa comprobación de la cantidad de la comida diaria ingerida normalmente. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua en todo momento. Tanto el peso corporal como la cantidad de comida ingerida se controlaron semanalmente para ajustar, en caso necesario, el tratamiento de Su a lo largo de las tres semanas.

### 3.1.2 Determinación de la presión arterial.

Durante el desarrollo del experimento hasta el día del sacrificio, se realizaron medidas semanales de la presión arterial sistólica (PAS) y de la frecuencia cardíaca (FC) a ambos grupos experimentales de ratas.

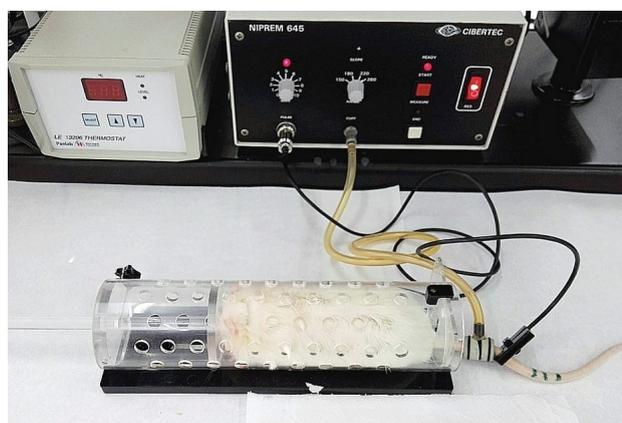
Para la toma de la presión arterial, se empleó el método indirecto de oclusión de la cola, utilizando el sistema de presión arterial no invasivo NIPREM 645 (CIBERTEC S.A, Madrid, España). Gracias a un transductor de señal los datos son registrados, procesados y representados por el software que de forma automática fija el valor para su posterior evaluación (Figura 3).



**Figura 3. Ejemplo de registro de presión arterial con el sistema NIPREM 645.**

En primer lugar, las ratas se inmovilizan en unos cepos cilíndricos adecuados a su tamaño para evitar posibles “ruidos” debido al movimiento de la rata durante las medidas. Previamente a la medición se realiza la vasodilatación de la cola del animal, colocando sobre la cola una lámpara de infrarrojos durante unos 10-15 minutos, evitando el contacto directo con esta. De esta forma al dilatar la arteria, se consigue tener una señal idónea y precisa. Durante todo el proceso deben evitarse posibles ruidos externos, o situaciones de estrés que puedan alterar el pulso del animal.

Tras la vasodilatación, se desconecta la lámpara y se coloca cerca de la base de la cola el manguito presurizador y el transductor de pulso cardíaco (Figura 4).



**Figura 4. Medida de presión arterial.** Se inmoviliza a la rata en un cepo y se coloca el manguito y el transductor en la cola para recoger posteriormente la señal en el sistema NIPREM 645.

En el instante en el que el transductor detecta el pulso uniforme en tiempo real, se aumenta la presión del manguito colapsando la arteria caudal, realizándose un ciclo de inflado-desinflado interrumpiéndose temporalmente la señal de pulso. Cuando la presión del manguito iguala a la presión sistólica del animal, el pulso se vuelve a detectar, pudiendo fijar dicho valor. Para

cada rata se realizaron de 3 a 4 medidas continuas de presión sistólica y de frecuencia cardíaca, promediando los valores obtenidos.

### 3.2 Obtención y procesado de muestras de estudio.

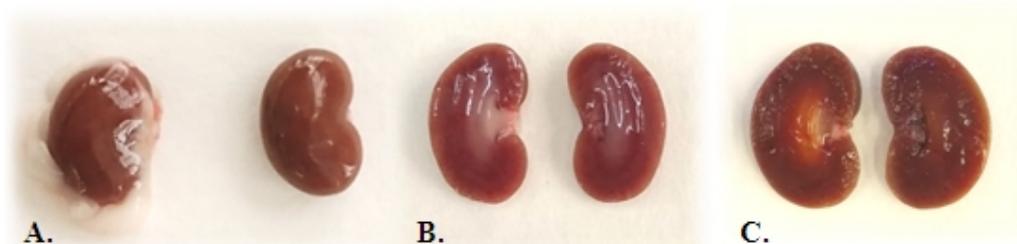
- Reactivos

- Hidrato de cloral al 6%.
- Suero fisiológico salino (Solución de NaCl al 0,9% p/v, 4°C).

Una vez finalizada la tercera semana de tratamiento, las ratas se anestesian a primera hora de la mañana, con una solución de hidrato de cloral al 6% (0,5ml /100g de peso corporal) mediante una punción vía intraperitoneal, evitando atravesar ningún órgano. Pasados unos 10-15 minutos, se confirma que el animal no responde a estímulos, presionándole las patas y se coloca en una tabla de disección en posición ventral.

Posteriormente, se extrae la sangre mediante una punción intracardiaca a través del tórax del animal, se realiza una disección del abdomen y se extirpan los riñones, objeto de este estudio. Seguidamente, los órganos se colocan en una placa de Petri con suero fisiológico frío y se limpian eliminando los restos de sangre y de tejido graso. Los riñones se decapsulan, eliminando la capa fibrosa externa con la ayuda de dos pinzas quirúrgicas, se secan en papel de filtro y se pesan en la balanza analítica.

Tras el pesaje, los riñones se cortan longitudinalmente con ayuda de un bisturí, dividiéndolos simétricamente, permitiendo visualizar claramente las tres zonas diferenciadas: una zona externa color pardo, que se corresponde con la zona cortical, una zona intermedia rosada que corresponde a la médula renal y una zona blanquecina que se corresponde con la pelvis (Figura 5).



**Figura 5. Anatomía renal.** (A) Izq. Riñón control con restos de tejido adiposo; Der. Riñón limpio y decapsulado. (B) Corte longitudinal de un riñón limpio y decapsulado perteneciente a una rata control. (C) Corte longitudinal de un riñón limpio y decapsulado perteneciente a una rata tratada con Su.

Posteriormente, se realizan cortes separando la zona cortical y desechando el resto del órgano. La corteza renal de cada rata se introdujo en microtubos eppendorf y se congeló por inmersión en nitrógeno líquido. Finalmente, se mantuvo en un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

### 3.3 Actividad de la enzima NADPH oxidasa

#### 3.3.1 Homogeneización del tejido renal

- Reactivos

- Tampón de homogeneización de tejidos

- PBS 1X (Tampón fosfato salino) ..... 900 $\mu\text{L}$

- Inhibidor de proteasas (*Mini Protease Inhibitor Cocktail, Sigma*) ..... 100 $\mu\text{L}$

Se estudió el papel de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, en el efecto nefrotóxico del Su y de esta forma analizar la importancia del estrés oxidativo en la patogénesis de este efecto.

En primer lugar, se realiza la homogeneización de la corteza renal. Para ello, previamente se pesan 100mg de tejido y se sumerge en 1 mL de tampón de homogeneización localizado en un homogeneizador de vidrio cilíndrico con émbolo de teflón. Seguidamente se procede a la homogeneización de la muestra en un homogeneizador *Heidolph RZR 2102*, aplicándole una velocidad de rotación de 400 rpm al émbolo. Durante la técnica, para evitar la desnaturalización de las proteínas, el vidrio se introduce en un recipiente con hielo para evitar el calentamiento producido por el rozamiento del teflón sobre este. La homogeneización del tejido se realiza de forma secuencial en intervalos de 15 segundos, con tiempos de pausa hasta tener un homogeneizado uniforme (con tres repeticiones fueron suficientes).

Posteriormente, se centrifuga el homogeneizado a 10000 x g durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , recogiendo el sobrenadante y descartando el precipitado con restos celulares.

### 3.3.2 Determinación de la concentración de proteínas

- Reactivos
  - *Bio-Rad*<sup>®</sup> *protein Assay*.
  - Gamma-globulina bovina ( $\gamma$ -globulina).

Para determinar la concentración de proteínas de los homogeneizados de corteza renal, se utilizó el método azul brillante de Coomassie descrito por Bradford (Bradford 1976), usando el reactivo *Bio-Rad*<sup>®</sup> *protein Assay*, junto a un estándar de  $\gamma$ -globulina. Este método se fundamenta en la formación de un complejo entre el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 presente en el reactivo *Bio-Rad*<sup>®</sup> *protein Assay* y las proteínas de nuestra muestra. La concentración de proteínas, del complejo proteína-colorante se determinará midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro, siendo proporcional la concentración de proteínas a la intensidad del color. La técnica consiste en incubar a temperatura ambiente en una microplaca ELISA, 5 $\mu$ L del sobrenadante de nuestro homogeneizado renal (diluidos previamente 1:40 con H<sub>2</sub>O bidestilada<sup>2</sup>) por triplicado, o los estándares (ST) por duplicado, con 250 $\mu$ L de reactivo *Bio-Rad*<sup>®</sup> *protein Assay* (previamente diluido 1:5 con H<sub>2</sub>O bidestilada a temperatura ambiente y filtrado con papel de Whatman n<sup>o</sup>1) (Figura 6).



**Figura 6. Microplaca Elisa de 96 pocillos cargada para la determinación de la concentración de proteínas.**

Tras unos 10 minutos en agitación, se determina la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a 595 nm en un plazo de 50 minutos, utilizando el lector de placas UVM 340, asociado a un programa de lectura denominado MikroWin 2000. Los datos se representan en mg/mL de proteínas. Para preparar las soluciones estándares se hicieron <sup>2</sup>Para que la concentración de proteínas de la muestra pueda interpolarse en un rango de absorbancias establecido por la curva patrón.

diluciones seriadas con agua destilada, a partir de una solución madre de  $\gamma$ -globulina con una concentración de 1,56mg/mL, construyendo la curva patrón con los siguientes puntos por duplicado: ST<sub>1</sub>:  $\gamma$ -globulina 0 mg/mL (agua bidestilada); ST<sub>2</sub> (1/8):  $\gamma$ -globulina 0,195 mg/mL; ST<sub>3</sub> (1/4):  $\gamma$ -globulina 0,39 mg/mL; ST<sub>4</sub> (1/2):  $\gamma$ -globulina 0,78 mg/mL; ST<sub>5</sub>:  $\gamma$ -globulina 1,56 mg/mL. Conociendo las concentraciones de los estándares y sus valores de absorbancias, podemos elaborar la curva patrón, permitiendo determinar la concentración de proteínas de nuestro homogeneizado a partir de sus respectivas absorbancias.

3.3.3 Determinación de la actividad de la NADPH oxidasa y caracterización de la fuente de anión superóxido.

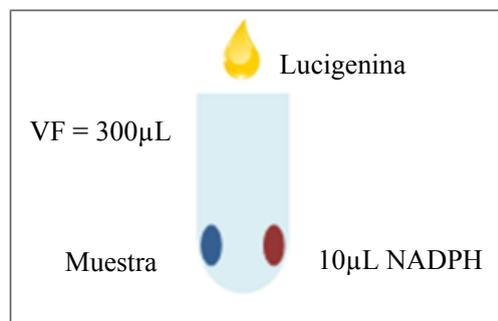
- Reactivos

- PBS 1X .....	25 mL
- NADPH .....	3 mM
- Lucigenina (N,N'-Dimetil-9,9'-biacridinio dinitrato) .....	5,35 $\mu$ M
- Difenileno iodonio (DPI) .....	10 mM
- Rotenona (ROT) .....	0,1 mM
- Oxipurinol (OXI) .....	0,1 mM

Para determinar la actividad NADPH oxidasa de la corteza renal, utilizamos una técnica basada en el fenómeno de quimioluminiscencia, es decir en la capacidad que tiene una reacción de liberar energía en forma de luz. La enzima NADPH oxidasa de la muestra, cataliza la reacción de oxidación en presencia de su sustrato (NADPH), dando lugar al radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Este producto, tiene la capacidad de oxidar a las moléculas de lucigenina<sup>3</sup>, liberándose energía en forma de fotones de luz, los cuales son rápidamente registrados en el luminómetro. Tras la determinación de la concentración de proteínas descrita anteriormente (apartado 3.3.2), se añade en el lateral de un tubo de poliestireno, una cantidad de muestra equivalente a 100 $\mu$ g de proteínas (suele ser entre 6 - 9  $\mu$ L de muestra), mientras en el otro extremo del tubo, se añade 10 $\mu$ L NADPH 3 mM (sustrato de la enzima NADPH oxidasa) intentando evitar el contacto con la muestra.

<sup>3</sup> La lucigenina es fotosensible, por lo que durante el experimento debe estar preservada de la exposición a la luz.

A continuación, se añade la lucigenina  $5,35\mu\text{M}$  (debe de estar previamente en el baño a  $37^\circ\text{C}$ ) hasta alcanzar un volumen final de  $300\mu\text{L}$  (Figura 7), permitiendo el contacto de la muestra y de la NADPH con esta. Inmediatamente dará comienzo la reacción por lo que se introduce el tubo rápidamente en el luminómetro (BERTHOLD Junior LB 9509) durante 4 minutos para realizar la medida.



**Figura 7. Determinación de la actividad de la NADPH oxidasa:** Distribución de la muestra y del sustrato NADPH, antes de la adicción de la lucigenina y por tanto del inicio de la reacción enzimática.

Los datos se expresan en unidades relativas de luz (URL) referidos a  $100\mu\text{g}$  de proteínas en 4 minutos. Las mediciones se harán alternando el orden de las muestras del grupo control, con las muestras del grupo experimental Su y cada una por triplicado realizando posteriormente la media aritmética. Para obtener el resultado neto, se le resta al valor, la medición del blanco, el cual se prepara de la misma forma a excepción de que no se le añade NADPH, completando hasta un volumen final de  $300\mu\text{L}$ .

Para caracterizar la fuente del radical anión superóxido de la muestra, se utilizaron distintos inhibidores, como el difenileno iodonio o DPI (inhibidor de las flavoproteínas, entre ellas destaca la NADPH oxidasa,  $10\text{mM}$ ), oxipurinol (OXI, inhibidor de la xantina oxidasa,  $0,1\text{mM}$ ) y rotenona (ROT, inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial,  $0,1\text{mM}$ ). En este caso, se coloca la muestra en el fondo del tubo, se le añade  $3\mu\text{L}$  del inhibidor de forma que contacten y se incuba 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se añade  $10\mu\text{L}$  de NADPH  $3\text{mM}$  en el lateral y se completa hasta un volumen final del  $300\mu\text{L}$  de lucigenina  $5,35\mu\text{M}$ . Inmediatamente comenzará la reacción por lo que se introduce en el luminómetro rápidamente para proceder a la medición, como se ha descrito anteriormente.

### 3.3.4 Análisis estadísticos.

Los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico GraphPad InStat y se expresaron

como la media  $\pm$  error estándar. La comparación entre los distintos parámetros en los diferentes grupos experimentales, se determinó aplicando el test de la  $t$  de Student, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores  $p < 0,05$ .

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

##### 4.1 Características de los animales de experimentación.

##### 4.1.1 Peso renal y su relación con el peso corporal.

Se realizó un seguimiento semanal del peso corporal de las ratas con la finalidad de determinar la ganancia de peso al final del tratamiento. En las ratas controles se observó una ganancia de peso de  $34 \pm 1,32$  g, mientras que en las ratas tratadas con Su, se determinó una disminución de peso de  $13 \pm 2$  g. Este descenso de peso significativo en el grupo de ratas tratadas con Su, coincide con resultados previos descritos por otros investigadores (Kappers et al. 2010; Machado et al. 2012). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el peso renal entre el grupo control y el grupo Su, como se ha determinado en estudios anteriores (Neves et al. 2018; Paech et al. 2018). Tampoco se observaron cambios en la relación peso riñón/peso corporal final de los grupos experimentales (Tabla 1), aunque sí se destaca una pigmentación amarilla observada en los riñones de las ratas tratadas (Figura 8).

	CONTROL	SUNITINIB
Peso riñón (g)	$1,85 \pm 0,096$	$1,85 \pm 0,132$
Peso riñón/Peso corporal final (%)	$0,61 \pm 0,017$	$0,63 \pm 0,03$

**Tabla 1. Peso renal y relación peso riñón/peso corporal final de las ratas pertenecientes al grupo control y al grupo Su.** Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de los seis animales de cada grupo experimental. No se observan diferencias significativas al comparar los grupos.

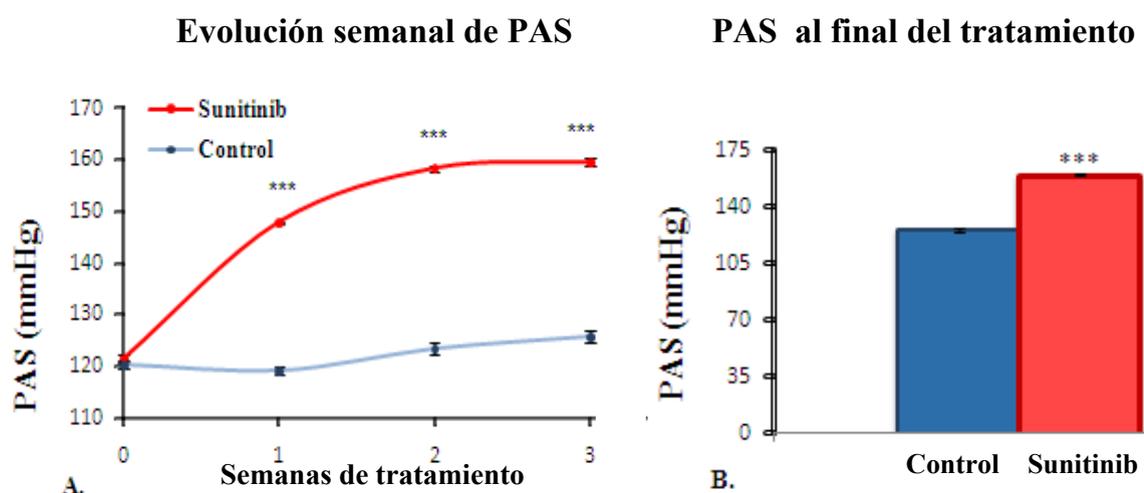


**Figura 8. Aspecto macroscópico renal.** Se observa una pigmentación amarilla en los riñones de las ratas sometidas al tratamiento, en comparación con la pigmentación rosada del grupo control.

## 4.2 Presión arterial sistólica y frecuencia cardíaca

En la Figura 9A, se representa la evolución de los valores promedio de la PAS de las ratas pertenecientes al grupo control, en comparación con las ratas pertenecientes al grupo Su, durante el periodo experimental. Según los resultados, los valores de PAS de las ratas tratadas, son significativamente mayores, observándose un incremento de PAS desde la primera semana, en comparación con los valores pertenecientes a las ratas controles.

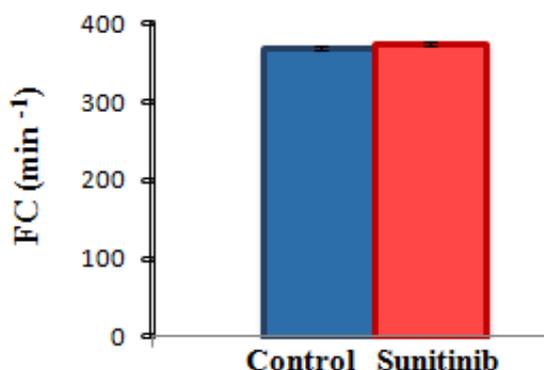
En la tercera semana de tratamiento se determinaron unos valores de PAS de  $159,6 \pm 0,66$  mmHg en ratas tratadas y de  $125,8 \pm 1,06$  mmHg en ratas controles (Figura 9B). Tal y como se observa, los valores de PAS obtenidos cada semana en ratas sometidas al tratamiento con Su, son significativamente mayores en comparación con los resultados obtenidos en el grupo control.



**Figura 9. (A) Evolución de la presión arterial sistólica (PAS) en ratas controles y en ratas tratadas con Su. (B) Valores de la PAS al final del tratamiento (tercera semana) en ratas controles y en ratas tratadas.** Los resultados de PAS están expresados en milímetros de mercurio (mmHg), y representan la media  $\pm$  SEM de los seis animales de cada grupo experimental. Significación estadística: \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el grupo control.

Por el contrario, al comparar los valores de frecuencia cardíaca (FC) al final del tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales de animales (Figura 10), obteniendo unos valores de  $368 \pm 2,98$   $\text{min}^{-1}$  para el grupo control y de  $374 \pm 2,8$   $\text{min}^{-1}$  para el grupo Su.

### Frecuencia cardíaca al final del tratamiento



**Figura 10. Valores de la frecuencia cardíaca (FR) al final del tratamiento (tercera semana) en ratas controles y en ratas tratadas con Su.** Los resultados de frecuencia cardíaca están expresados minutos<sup>-1</sup>, y representan la media  $\pm$  SEM de los seis animales de cada grupo experimental. No se observaron diferencias significativas al comparar los grupos.

La angiogénesis, y la proliferación son procesos críticos para el desarrollo tumoral, el cual es dependiente de la activación del receptor de tirosina kinasa VEGFR. Por ello, la inhibición del VEGFR a través de tratamientos antiangiogénicos como el Su, es clave para evitar la proliferación del carcinoma y la metástasis. Sin embargo, la inhibición de esta vía de señalización, se asocia a una toxicidad cardiovascular como se ha descrito anteriormente (apartado 1.2.3) (Touyz et al. 2017). La inducción de la HTA producida por las terapias con TKIs, es uno de los efectos adversos más comunes (Lankhorst et al. 2014), siendo un marcador temprano de la eficacia tumoral, visible desde las primeras semanas de tratamiento (Blasi et al. 2012; Leon and Antón-Aparicio 2015). Este rápido incremento en la PAS se ha documentado en diversos estudios, para diferentes TKI como son el Sorafenib, el vandetanib, el cediranib, el pazopanib (Carter, Fretwell, and Woolard 2017) y el Su (Chu et al. 2007; Lankhorst, Kappers, van Esch, et al. 2014), iniciándose una meseta en los valores de PAS a los seis días de tratamiento con Su (Machado et al. 2012), coincidiendo con los resultados de este estudio experimental. Sin embargo, otros autores no observaron un aumento en los valores PAS en ratones tratados con el vatalanib (Neves et al. 2018), lo cual lo vinculan al uso de una dosis baja.

En relación a la frecuencia cardíaca, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. No obstante, en otro estudio los valores de FC disminuyeron, tras 8 días de tratamiento con una dosis de 26,7 mg de Su/ Kg peso corporal /día, lo cual lo asociaron al incremento de la PAS (Lankhorst et al. 2014). Esta reducción en la FC también fue descrita en estudios previos en nuestro grupo de investigación, aunque con una mayor duración del

tratamiento con Su (8 semanas), para la misma dosis del fármaco usada en este estudio (Zambrano Sevilla 2013). Los mecanismos por los cuales se desarrolla la HTA no están del todo claros (Touyz et al. 2017), aunque se han propuesto diversas teorías no excluyentes. En un estudio reciente (Carter, Fretwell, and Woolard 2017), el incremento de la presión arterial lo asocian a una vasoconstricción, implicando la disminución de la expresión génica de la eNOS con la consecuente disminución, del agente vasodilatador NO. Otras causas son la disminución de la densidad de microvasos (rarefacción) (Leon and Antón-Aparicio 2015), como consecuencia de la vasoconstricción e inhibición de NO, siendo reversible al retirar el tratamiento (Touyz et al. 2017), la generación de radicales libres con el consiguiente estrés oxidativo, y el incremento de los niveles del vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1) (Leon and Antón-Aparicio 2015) liberado por el endotelio, el cual se determinó tanto en pacientes como en ratas tratadas con Su (Touyz et al. 2017). Además, la inhibición del VEGFR puede llevar a la inhibición de los canales de calcio y al aumento de este ión, estando involucrado en los cambios del tono vascular, activando la contracción muscular de los vasos (Touyz et al. 2017).

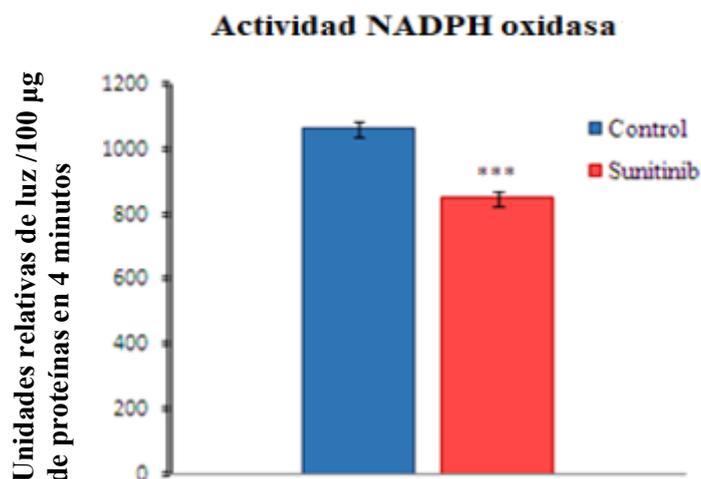
Todo puede contribuir a un aumento del tono vascular y una remodelación arterial (Touyz et al. 2017), dando lugar a un aumento en la resistencia periférica vascular, lo que podría preceder a la aparición de HTA y en paralelo obtener un suministro sanguíneo ineficiente. Incluso algunos autores atribuyen que los cambios en la vasculatura pueden ser tanto el efecto y la causa del desarrollo fisiopatológico de la HTA (Pries 2014).

En relación con el riñón, se ha demostrado que el aumento de la PAS inducida por el tratamiento con Su, parece empeorar con una dieta rica en sodio, a causa de una reducción de la natriuresis renal, contribuyendo a un aumento del volumen y por tanto al desarrollo de la HTA (Lankhorst et al. 2017). De acuerdo con otros informes, la reducción en la tasa de filtración glomerular renal, parece estar asociado con el aumento de la presión arterial (Hirayama et al. 2015; Mahbub et al. 2019).

#### **4.3 Actividad NADPH oxidasa y caracterización de la fuente de anión superóxido en corteza renal.**

En este experimento se obtuvieron unos valores de actividad NADPH oxidasa (expresados en URL/100 µg de proteínas en 4 minutos) de  $1063 \pm 2,78$  en las cortezas renales pertenecientes a las ratas del grupo control, que se extrapolaron al 100% de actividad. Por otro lado, en las

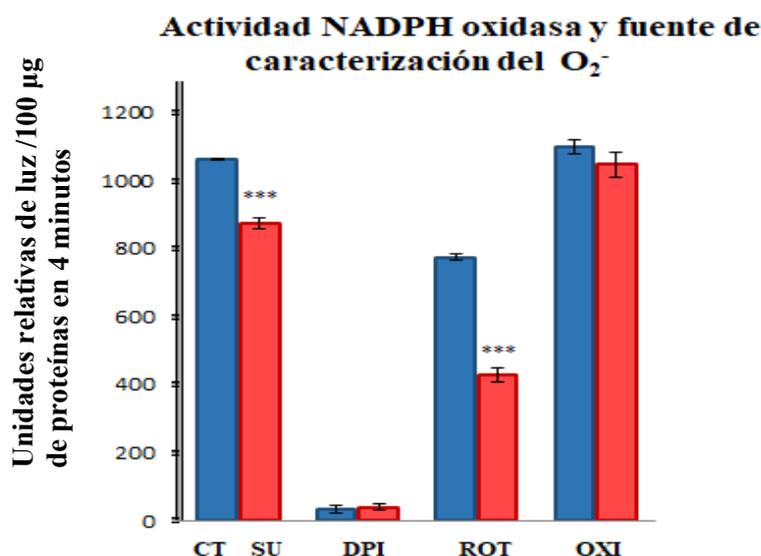
ratas tratadas con Su, se observaron unos valores de actividad enzimática significativamente menores, con unos resultados de  $850 \pm 21,53$  (Figura 11) ( $p < 0,001$ ), que equivale a un 79,96% de actividad, obteniéndose una disminución del 20,33% en la actividad NADPH oxidasa en los riñones de las ratas sometidas al tratamiento con Su, en comparación con el grupo control.



**Figura 11. Actividad NADPH oxidasa en la corteza renal de los grupos experimentales.** Los resultados están expresados en unidades relativas de luz (URL) referidos a 100 µg de proteínas en 4 minutos, y representan la media  $\pm$  SEM de los seis animales de cada grupo experimental. Significación estadística: \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el grupo Control.

Además caracterizamos la fuente de  $O_2^-$  presente en las muestras de ambos grupos experimentales, usando inhibidores selectivos como se describe en el apartado de materiales y métodos. Según los valores obtenidos (expresados en la Figura 12 como URL/100 µg de proteínas en 4 minutos), y al extrapolar los resultados en porcentajes de inhibición, se concluye que DPI, inhibió en su totalidad la producción de  $O_2^-$  en ambos grupos de animales, con un 95% de inhibición para el grupo control y de 97% para el grupo Su, no observándose diferencias significativas entre los grupos.

En el caso del inhibidor rotenona (ROT), se determinó un porcentaje de inhibición del 27% para el grupo control y del 50% para el grupo Su, con una significación estadística de  $p < 0,001$ , comparado con el grupo control. En el caso del oxipurinol (OXI), no se observó inhibición en la producción de  $O_2^-$ , ni diferencias significativas entre los grupos.



**Figura 12. Actividad NADPH oxidasa en la corteza renal de los grupos experimentales y caracterización de la fuente de  $O_2^-$ .** En esta figura se representa la actividad NADPH oxidasa en el grupo control (CT) y en el grupo Su y la caracterización de la fuente de anión superóxido, al utilizar los inhibidores DPI, rotenona (ROT) y oxipurinol (OXI). Los resultados están expresados en unidades relativas de luz (URL) referidos a 100 µg de proteínas en 4 minutos, y representan la media  $\pm$  SEM de los seis animales de cada grupo experimental. Significación estadística: \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el grupo control.

Estos resultados nos indican que la enzima NADPH oxidasa (NOX) es la responsable de la producción de  $O_2^-$ , ya que la presencia de DPI inhibe su generación casi en un 100%. Además, y en base a los resultados obtenidos, no se observa un incremento en la actividad de la enzima NOX en las ratas tratadas con Su, en comparación con el grupo control. Por lo que podría concluirse que la enzima NADPH oxidasa no parece estar implicada en el efecto nefrotóxico inducido por el tratamiento con Su.

Sin embargo, basándonos en estudios recientes realizado en ratones, tras tratamiento con vatalanib (inhibidor específico de VEGFR2) durante dos semanas, se incrementó la producción de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  en el tejido renal, aunque la dosis en este estudio fue de 100 mg de vatalanib/kg peso corporal/día (3 veces superior a la nuestra) (Neves et al. 2018). Según los autores, este aumento de ROS en el tejido renal, se debió a una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa-1, así como en el factor de transcripción Nrf-2, factor responsable de la regulación génica de estas enzimas. Aunque el incremento en la producción de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  dependientes de la enzima NADPH oxidasa en animales tratados con vatalanib fue significativo, los resultados demostraron una menor expresión de ARNm de la NOX4 (isoforma de la NADPH oxidasa mayoritaria en riñón), sin

cambios en la expresión de la NOX1 y NOX2 en los ratones tratados con vatalanib, en comparación con el grupo control. Además el fármaco incrementó los niveles de  $O_2^-$  en células endoteliales humanas de aorta, lo que se asoció a un aumento en la expresión del regulador p47phox de la enzima NADPH oxidasa. En este caso, la expresión de la isoforma NOX4 disminuyó y la de NOX5 aumentó en los animales tratados con vatalanib en comparación con el grupo control (Neves et al. 2018).

Estudios basados en células del músculo liso vascular de ratas hipertensas, también demostraron el incremento en la producción de  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  (Camargo et al. 2018; Rajagopalan et al. 1996), acompañado de una mayor expresión de las isoformas NOX1 y NOX4, en compartimentos celulares específicos, contribuyendo a diferentes eventos redox relacionados con la hipertensión (Camargo et al. 2018). En cambio en corazón y aorta, se redujo la producción de estos radicales, aunque aumentó los niveles del agente oxidante ONOO $^-$  y la expresión génica a nivel de corazón de NOX1, sin cambios en la NOX2 y NOX4 (Neves et al. 2018).

Por otro lado, en nuestro estudio al incubar las muestras con rotenona (ROT), inhibidor de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, concretamente del complejo I (Hua et al. 2019), se ha determinado una mayor inhibición en la producción de  $O_2^-$  en las ratas tratadas con Su, en comparación con las ratas controles. Este hallazgo sugiere que la generación de  $O_2^-$  en las ratas tratadas, procede en una mayor parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esto podría deberse a una disfunción mitocondrial inducida por Su ya descrita previamente (Paech et al., 2018; Paech, Bouitbir, & Krähenbühl, 2017). Así, en investigaciones previas mediante micrografías electrónicas de transmisión, se identificó una morfología mitocondrial aberrante en biopsias endomiocárdicas de pacientes que desarrollaron una disfunción sistólica durante la terapia con Su, y en corazones de ratones en tratamiento. Además, en cultivos de cardiomiocitos, Su indujo la liberación del citocromo C mitocondrial, llevando a la activación de la caspasa-9 iniciadora de la apoptosis (Chu et al. 2007). En análisis metabólico no dirigido, se demostró que el tratamiento antiangiogénico con Su, reduce la cantidad de importantes mediadores anti-inflamatorios y de reguladores mitocondriales, lo que podría causar una disfunción mitocondrial (Jensen et al. 2017) demostrándose el daño mitocondrial inducido por Su tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha descrito en cultivos de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano, que el Su y otros TKI como el imatinib y el lapatinib, generan una disminución del potencial de

membrana mitocondrial, actuando el Su como un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. El deterioro del potencial de membrana también se demostró *in vivo* en mitocondrias de células hepáticas de ratones tratados con Su, observándose una reducción en la expresión génica del complejo II (generador de  $O_2^-$ ) y en las subunidades proteicas de los complejos III, IV y V con respecto al grupo control no sometido al tratamiento (Paech, Bouitbir, and Krähenbühl 2017). En otras investigaciones recientes, se determinó la actividad NADPH oxidasa en muestras mitocondriales de hepatocitos de ratas controles y de ratas tratadas con Su (7,5mg de Su/ kg peso corporal/día), y en presencia de concentraciones crecientes de Su exógeno (Paech et al. 2018). Según los autores, se observó una reducción no significativa del 8% en la actividad NADPH oxidasa en las mitocondrias hepáticas de los ratones tratados, en comparación con el grupo control. Sin embargo, aunque la actividad de la NOX a nivel de hígado no parece diferir entre ambos grupos, la adicción del Su exógeno a las muestras, causó una disminución significativa en la actividad NADPH oxidasa tanto en los ratones controles, como en los tratados con Su, sin diferencias entre los grupos.

Para concluir y en base a lo expuesto, es de vital importancia el aporte de nuevas investigaciones, para obtener un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares que preceden al desarrollo de la hipertensión durante el tratamiento con TKI dirigido a pacientes con cáncer. Con la finalidad de reducir los efectos adversos descritos y evitar la disfunción cardíaca y renal, así como, poder avanzar en la búsqueda de nuevas terapias oncológicas sin impactar en sus beneficios terapéuticos (Touyz et al. 2017).

## 5. CONCLUSIONES

1. La presión arterial sistólica aumenta de forma significativa en las ratas tratadas con Su, en comparación con las ratas controles. Este aumento se pone de manifiesto desde la primera semana de tratamiento. Sin embargo la frecuencia cardíaca no parece alterarse con el tratamiento.
2. En nuestras condiciones experimentales, la enzima NADPH oxidasa no parece estar implicada en el efecto nefrotóxico del sunitinib.
3. El tratamiento con Su podría conducir a una disfunción mitocondrial, que podría estar implicada en la nefrotoxicidad inducida por este fármaco.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Aparicio-Gallego, G. et al. 2011. “New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects.” *Molecular cancer therapeutics* 10(12): 2215–23.
2. Blasi, E. et al. 2012. “Sunitinib, a receptor tyrosine kinase inhibitor, increases blood pressure in rats without associated changes in cardiac structure and function.” *Cardiovascular therapeutics* 30(5): 287–94.
3. Bradford, M.M. 1976. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding” *Analytical biochemistry* 72:248-254. .
4. Brandes, R.P. 2010. “Vascular functions of NADPH oxidases.” *Hypertension* 56(1): 17–21.
5. Brandt, M. et al. 2018. “Pulmonary arterial hypertension and endothelial dysfunction Is linked to NADPH Oxidase-derived superoxide formation in venous thrombosis and pulmonary embolism in mice.” *Oxidative medicine and cellular longevity* 2018: 1–10.
6. Camargo, L. et al. 2018. “Vascular Nox (NADPH Oxidase) Compartmentalization, Protein Hyperoxidation, and Endoplasmic Reticulum Stress Response in Hypertension.” *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 72(1): 235–46.
7. Carter, J.J., Fretwell, L.V. and Woolard, J. “Effects of 4 multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors on regional hemodynamics in conscious, freely moving rats.” *FASEB journal : official publication of the federation of american societies for experimental biology* 31(3): 1193–1203.
8. Chu, T.F. et al. 2007. “Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib.” *Lancet* 370(9604): 2011–19.
9. Costero, O. et al. 2010. “Inhibition of tyrosine kinases by sunitinib associated with focal segmental glomerulosclerosis lesion in addition to thrombotic microangiopathy.” *Nephrology dialysis transplantation* 25(3): 1001–3.
10. Dong, W.K. et al. 2006. “An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases.” *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(10): 4070–76.
11. Eremina, V. et al. 2003. “Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases.” *Journal of clinical investigation* 111(5): 707–16.
12. Faivre, S. et al. 2017. “Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors: updated progression-free survival and final overall survival from a phase III randomized study.”

- Annals of oncology* 28(2): 339–43.
13. Gautam, J. et al. 2017. “Dual inhibition of NOX2 and receptor tyrosine kinase by BJ-1301 enhances anticancer therapy efficacy via suppression of autocrine-stimulatory factors in lung cancer.” *Molecular cancer therapeutics* 16(10): 2144–56.
  14. Hansen, C.R. et al. 2017. “Effects and side effects of using Sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma.” *International journal of molecular sciences* 18(2).
  15. Hao, Z., and Sadek, I.. 2016. “Sunitinib: the antiangiogenic effects and beyond.” *OncoTargets and therapy* 9: 5495–5505.
  16. Hirayama, A. et al. 2015. “Blood pressure, proteinuria, and renal function decline: Associations in a large community-based population.” *American journal of hypertension* 28(9): 1150–56.
  17. Hua, H. et al. 2019. “Inhibition of the mitochondrial complex-1 protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury.” *Biomedicine & pharmacotherapy* 115: 108948.
  18. Incalza, M.A. et al. 2018. “Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases.” *Vascular pharmacology* 100: 1–19.
  19. Ishihara, H. et al. 2017. “Evaluation of renal function change during first-line tyrosine kinase inhibitor therapy for metastatic renal cell carcinoma.” *Japanese journal of clinical oncology* 47(12): 1175–81.
  20. Ishii, S. et al. 2013. “Sunitinib, a small-molecule receptor tyrosine kinase inhibitor, suppresses neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery.” *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 18(4): 359–66.
  21. Jensen, B.C. et al. 2017. “Non-targeted metabolomics analysis of the effects of tyrosine kinase inhibitors sunitinib and erlotinib on heart, muscle, liver and serum metabolism in vivo.” *Metabolites* 7(3).
  22. De Jesus-Gonzalez, N. et al. 2012. “Management of antiangiogenic therapy-induced hypertension.” *Hypertension* 60(3): 607–15.
  23. Kappers, M.H.W. et al. 2010. “Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels.” *Hypertension* 56(4): 675–81.
  24. Lankhorst, S. et al. 2014. “Treatment of hypertension and renal injury induced by the angiogenesis inhibitor sunitinib.” *Hypertension* 64(6): 1282–89.
  25. Lankhorst, S. et al. 2014. “Treatment of hypertension and renal injury induced by the

- angiogenesis inhibitor sunitinib preclinical study kidney.” *Hypertension* 64(6): 1282–1289.
- 26.Lankhorst, S. et al. 2017. “Salt sensitivity of angiogenesis inhibition–induced blood pressure rise.” *Hypertension* 69(5): 919–26.
- 27.Lenis, A.T. et al. 2018. “Adjuvant therapy for high risk localized kidney cancer: emerging evidence and future clinical trials.” *Journal of urology* 199(1): 43–52.
- 28.Leon, L.A., and Antón-Aparicio. L.M. 2015. “Treatment of sunitinib-induced hypertension in solid tumors by nitric oxid donors.” *Redox biology* 5: 422.
- 29.Machado, F.G. et al. 2012. “Chronic VEGF Blockade worsens glomerular injury in the remnant kidney model.” *PLoS ONE* 7(6).
- 30.Mahbub, M.H. et al. 2019. “Relationship of reduced glomerular filtration rate with alterations in plasma free amino acids and uric acid evaluated in healthy control and hypertensive subjects.” *Scientific reports* 9(1): 10252.
- 31.Mendel, D.B., Cherrington, J.M. and Douglas-Laird, A. 2015. “CCR 20th anniversary commentary: determining a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship for sunitinib- a look back.” *Clinical cancer research : an official journal of the american association for cancer research* 21(11): 2415–17.
- 32.Montezano, A.C. and Touyz, R.M.. 2012. “Molecular mechanisms of hypertension-reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician.” *Canadian journal of cardiology* 28(3): 288–95.
- 33.Motzer, R.J. et al. 2007. “Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma.” *New england journal of medicine* 356(2): 115–24.
- 34.Neves, K.B. et al. 2018. “VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) inhibition induces cardiovascular damage via redox-sensitive processes.” *Hypertension* 71(4): 638–47.
- 35.Noronha, V. et al. 2016. “Current evidence and the evolving role of sunitinib in the management of renal cell carcinoma.” *Indian journal of cancer* 53(1): 102.
- 36.Novello, S. et al. 2009. “Phase II study of continuous daily sunitinib dosing in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer.” *British journal of cancer* 101(9): 1543–48.
- 37.Ozsurekci, Y. and Aykac, K. 2016. “Oxidative stress related diseases in newborns.” *Oxidative medicine and cellular longevity* 2016: 1–9.
- 38.Paech, F. et al. 2018. “Sunitinib induces hepatocyte mitochondrial damage and apoptosis in mice.” *Toxicology* 409: 13–23.

39. Paech, F., Bouitbir, K. and Krähenbühl, S. 2017. "Hepatocellular toxicity associated with tyrosine kinase inhibitors: mitochondrial damage and inhibition of glycolysis." *Frontiers in pharmacology* 8: 367.
40. Pries, A.R. 2014. "Perspectives: microcirculation in hypertension and cardiovascular disease." *European heart journal, supplement* 16(SUPPL.A).
41. Del Puerto-Nevado, L. et al. 2014. "Active angiogenesis in metastatic renal cell carcinoma predicts clinical benefit to sunitinib-based therapy." *British journal of cancer* 110(11): 2700–2707.
42. Qin, S. et al. 2019. "Recent advances on anti-angiogenesis receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy." *Journal of hematology and oncology* 12(1).
43. Rajagopalan, S. et al. 1996. "Angiotensin II-Mediated Hypertension in the Rat Increases Vascular Superoxide Production via Membrane NADH/NADPH Oxidase Activation." *The Journal of Clinical Investigation* 97(8): 1916–1923
44. Ratliff, B.B. et al. 2016. "Oxidant mechanisms in renal injury and disease." *Antioxidants & Redox signaling* 25(3): 119–46.
45. Rautiola, J. et al. 2016. "Sunitinib induced hypertension, neutropaenia and thrombocytopaenia as predictors of good prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma." *BJU International* 117(1): 110–17.
46. Ravaud, A. et al. 2016. "Adjuvant sunitinib in high-risk renal-cell carcinoma after nephrectomy." *New england journal of medicine* 375(23): 2246–54.
47. Sanchez, A. et al. 2013. "Sunitinib enhances neuronal survival in vitro via NF-KB-mediated signaling and expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase." *Journal of neuroinflammation* 10. Article number 875 .
48. Scartozzi, M. et al. 2013. "VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib." *British journal of cancer* 108(5): 1126–32.
49. Schmid, T.A., and Gore M.E. 2016. "Sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma." *Therapeutic advances in urology* 8(6): 348–71.
50. Schröder, K. et al. 2012. "Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase." *Circulation research* 110(9): 1217–25.
51. Shukla, S. et al. 2009. "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 metabolism and disposition* 37(2): 359–65.
52. Sun, B. et al. 2016. "Sunitinib as salvage treatment including potent anti-tumor activity in

- carcinomatous ulcers for patients with multidrug-resistant metastatic breast cancer.” *Oncotarget* 7(36).
53. Tocchetti, C.G. et al. 2019. “From molecular mechanisms to clinical management of antineoplastic drug-induced cardiovascular toxicity: A translational overview.” *Antioxidants & Redox Signaling* 30(18): 2110–53.
54. Touyz, R.M. et al. 2017. “Recent advances in hypertension and cardiovascular toxicities with vascular endothelial growth factor inhibition.” *Hypertension* 70(2):220–26.
55. Yang, J.C. et al. 2003. “A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer.” *New England Journal of Medicine* 349(5): 427–34.
56. Zambrano-Sevilla, S. 2013. “Acción protectora de la L-Carnitina en la nefropatía hipertensiva.” [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia.
57. Zhu, X., Stergiopoulos, K. and Wu, S. 2009. “Risk of Hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: Systematic review and meta-analysis.” *Acta oncologica* 48(1): 9–17.