



FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**EVALUACIÓN DEL DAÑO VASCULAR TRAS EL  
TRATAMIENTO CON SUNITINIB: DISFUNCIÓN  
ENDOTELIAL Y MECANISMOS PATOGENICOS  
IMPLICADOS**

Tesis doctoral  
**CLAUDIA REYES GOYA**

Sevilla, 2021



CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla; ALFONSO MATE BARRERO, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla

INFORMAN

Que la Tesis titulada EVALUACIÓN DEL DAÑO VASCULAR TRAS EL TRATAMIENTO CON SUNITINIB: DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y MECANISMOS PATOGENICOS IMPLICADOS, presentada por CLAUDIA REYES GOYA para optar al grado de doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Sevilla, a 18 de Febrero de 2021

Fdo.: Dra. Carmen M<sup>a</sup> Vázquez Cueto

Fdo.: Dr. Alfonso Mate Barrero



Parte de los resultados presentados en esta tesis doctoral han sido publicados en la revista *Toxics* en 2020 bajo el título *Mechanism of Vascular Toxicity in Rats Subjected to Treatment with a Tyrosine Kinase Inhibitor*, y han sido presentados en congresos nacionales e internacionales:

- 23ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (Zaragoza, 2018).
  - Reyes-Goya, C., Santana-Garrido A., Fernández de Bobadilla Carrasco, C., Blanca Lobato, A., Mate Barrero, A., Vázquez Cueto, C. 'Función endotelial y NADPH oxidasa en aortas de ratas tratadas con Sunitinib'. *Hipertens Riesgo Vasc.* 2018; 35(Espec Congre):1-10.
- XXXIX Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) (Cádiz, 2018).
  - Reyes-Goya, C., Santana-Garrido A., Fernández de Bobadilla Carrasco, C., Blanca Lobato, A., Mate Barrero, A., Vázquez Cueto, C. 'Study of the vascular damage in aortas from Sunitinib treated rats'. *Journal of Physiology and Biochemistry.* 2018. Vol. 74. Núm. Suppl1. 10.1007/s13105-018-0656-7.
- IV Congreso Nacional Jóvenes Investigadores en Biomedicina (Granada, Spain, 2020). Virtual scientific communication (poster) 'Tyrosine kinase inhibitor treatment: release of extracellular vesicles and oxidative stress imbalance'.
- XV Foro de Investigadores del IBIS (Sevilla, 2018). Póster titulado "Vascular remodeling and NADPH oxidases in thoracic aortas from Sunitinib treated rats".
- *Advances in the Study of Lipid and Protein Oxidation: From Methods to Targets* (Ghent, Bélgica, 2019). Póster titulado "The role of NADPH oxidase System in the vascular damage induced by sunitinib".
- Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas + Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas 2020 Joint Meeting (Chile, 2020). Virtual scientific communication (poster) 'Cross-linking between oxidative stress and circulating extracellular vesicles after tyrosine kinase inhibitor treatment'.



# **AGRADECIMIENTOS**





***A mis padres,  
A mi hermana.***



Dice la frase: “A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”. Quisiera agradecer a todas las personas que me han apoyado durante este camino para realizar esta tesis doctoral:

A mis directores de tesis, la Dra. Carmen María Vázquez Cueto y el Dr. Alfonso Mate Barrero. Por darme la oportunidad de comenzar esta tesis doctoral y guiarme en diferentes aspectos y etapas durante estos años. Ha sido duro el camino, pero vuestras enseñanzas me han servido para crecer a nivel personal y profesional.

A mi Madre. Mi todo; el pilar fundamental de mi vida en todos los momentos: antes, durante y después de esta tesis doctoral. Ni los años ni la distancia que transcurren a medida que voy creciendo podrán menguar el amor que siento por ti.

A mi Padre. Gracias por apoyarme y habérmelo dado todo, tanto las ganas como los medios para conseguir este pequeño sueño. Soy consciente de la suerte que tengo al saber que en los momentos más importantes siempre estás ahí.

A mi Hermana. Comenzamos juntas esta etapa lejos de casa, siempre teniéndonos la una a la otra. Espero servirte de referencia y ser tu apoyo en todos y cada uno de los caminos que tomes en tu vida.

A mis abuelos. A mi abuela Kika y a mi abuelo Juan porque siempre están preocupados por “cómo me van yendo las clases”, y a mi abuela Mari porque sé que estaría orgullosa de mí, aunque hayas tenido que irte antes de tiempo.

A los integrantes del Departamento de Fisiología, en especial a los doctores Sandro Argüelles, Antonio Blanca, Livia Carrascal, Pablo García y Lola Vázquez. Siempre apoyando a los más jóvenes cuando algún experimento se ha torcido, fomentando un agradable ambiente de trabajo y amenizando las largas jornadas de trabajo.

Al Dr. Jaakko Patrakka y su grupo, por tratarme como una más y hacer amena mi estancia en Suecia, que recuerdo con tanto cariño. A la Dra. Sonia Zambrano por ser mi mentora en el *Karolinska Institutet* y darme tan valiosos consejos tanto en lo profesional como en lo personal.

A todos lo que he tenido el placer de conocer en el laboratorio. En especial a mis colegas Adelina, Álvaro y Carmen *Hippie* con quien he compartido sin duda grandes momentos dentro y fuera del laboratorio, ya sea durante largas horas de *Western blotting* con charlas existenciales, misiones imposibles, y un sinfín de historias para recordar.

A mis amigos y compañeros de doctorando. Gracias por estar ahí. Si algo he aprendido es que “el éxito en cualquiera de sus formas, en el resultado de hacer las cosas con perseverancia”.

Y por supuesto a Álvaro, mi compañero de tesis y de vida. Gracias por tu amor y tu amistad. Ha sido una suerte coincidir contigo, espero sientas por mi parte, el mismo apoyo incondicional para terminar tu tesis doctoral.

A todos los que de alguna manera u otra hayan contribuido a este trabajo, y se interesen en el futuro por él, muchas gracias.



# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Receptores e inhibidores de tirosina quinasa.....	3
1.2. Sunitinib. Mecanismo de acción. ....	5
1.2.1. <i>Indicaciones terapéuticas. Propiedades farmacocinéticas.</i> .....	6
1.2.2. <i>Efectos adversos. Toxicidad cardiovascular e hipertensión arterial inducida por sunitinib.</i> .....	7
1.2.3. <i>Mecanismos etiopatogénicos subyacentes al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa.</i> .....	10
1.3. Estrés oxidativo. Implicaciones en el sistema cardiovascular. ....	12
1.3.1. <i>Sistema NADPH oxidasa. Implicación en el desarrollo de la hipertensión arterial.</i> 16	
1.3.2. <i>Sistemas de defensa antioxidante.</i> .....	22
1.4. Estructura de la pared vascular: morfología e histología de la arteria aorta. ....	22
1.4.1. <i>Remodelación vascular e hipertensión arterial.</i> .....	25
1.4.2. <i>Fibrosis e hipertensión arterial.</i> .....	28
1.4.3. <i>El papel del TGF-<math>\beta</math>1 en el desarrollo de la fibrosis e hipertensión arterial.</i> .....	30
1.5. Vesículas extracelulares. Implicación en el desarrollo de enfermedades.....	31
1.5.1. <i>Clasificación, composición y biogénesis de vesículas extracelulares.</i> .....	31
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
2.1. Hipótesis del estudio. ....	39
2.2. Objetivos. ....	39
2.2.1. <i>Objetivo general.</i> .....	39
2.2.2. <i>Objetivos específicos.</i> .....	40
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
Lista de reactivos y anticuerpos. ....	45
Preparación de reactivos y tampones. ....	49
3.1. Animales de experimentación y tratamiento. ....	53
3.2. Control de la presión arterial. ....	54
3.3. Obtención de muestras de estudio y de las vesículas extracelulares. ....	55
3.4. Estudio de la función vascular. ....	56
3.4.1. <i>Curva dosis-respuesta.</i> .....	57
3.5. Análisis en homogeneizados de aorta. Estudios de expresión génica y proteica.....	58
3.5.1. <i>Homogeneización de la aorta.</i> .....	58
3.5.2. <i>Determinación de la concentración de proteínas.</i> .....	59
3.5.3. <i>Determinación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa.</i> .....	59
3.5.4. <i>Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.</i> .....	60
3.5.5. <i>Determinación de la producción de óxido nítrico.</i> .....	61
3.6. Estudios de expresión génica. ....	62
3.6.1. <i>Extracción de ARN total.</i> .....	62
3.6.2. <i>Retrotranscripción.</i> .....	64
3.6.3. <i>PCR a tiempo real (RT-PCR).</i> .....	64
3.7. Estudios de expresión proteica. ....	66
3.7.1. <i>Fundamento del Western blotting.</i> .....	66
3.7.2. <i>Preparación de las muestras.</i> .....	67
3.7.3. <i>Electroforesis.</i> .....	68
3.7.4. <i>Transferencia.</i> .....	69
3.7.5. <i>Inmunodetección.</i> .....	69
3.8. Estudios histológicos.....	70
3.8.1. <i>Procesado de los tejidos.</i> .....	70
3.8.2. <i>Fijación.</i> .....	70
3.8.3. <i>Deshidratación.</i> .....	71

3.8.4.	<i>Inclusión en parafina y formación de bloques</i> .....	71
3.8.5.	<i>Inclusión en resina y formación de bloques</i> .....	71
3.8.6.	<i>Obtención de cortes de tejido</i> .....	72
3.8.7.	<i>Tinción de hematoxilina-eosina</i> .....	72
3.8.8.	<i>Tinción tricrómica (Masson)</i> .....	74
3.8.9.	<i>Tinción fluorescente con dihidroetidio</i> .....	75
3.8.10.	<i>Inmunofluorescencia</i> .....	76
3.9.	<i>Análisis estadístico</i> .....	77
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>79</b>
4.1.	<i>Características generales de los animales</i> .....	81
4.1.1.	<i>Ganancia de peso</i> .....	81
4.1.2.	<i>Presión sanguínea</i> .....	81
4.2.	<i>Estudios de reactividad vascular</i> .....	82
4.2.1.	<i>Contracción inducida por fenilefrina</i> .....	83
4.2.2.	<i>Relajación dependiente de endotelio</i> .....	83
4.2.3.	<i>Relajación independiente de endotelio</i> .....	85
4.3.	<i>Efecto de la preincubación con vesículas extracelulares sobre la reactividad vascular</i> .....	86
4.3.1.	<i>Contracción inducida por fenilefrina previa incubación con vesículas extracelulares</i> .....	86
4.3.2.	<i>Relajación dependiente de endotelio previa incubación con vesículas extracelulares</i> .....	87
4.4.	<i>Estudio histomorfométrico y fibrótico de la aorta</i> .....	89
4.4.1.	<i>Tinción de hematoxilina-eosina</i> .....	89
4.4.2.	<i>Fibrosis: tinción con tricrómico de Masson. Presencia y localización de colágeno tipo I. Expresión génica y proteica de factores (pro) fibróticos</i> .....	90
4.5.	<i>Estado oxidativo vascular</i> .....	93
4.5.1.	<i>Actividad de la enzima NADPH oxidasa</i> .....	93
4.5.2.	<i>Tinción fluorescente de dihidroetidio</i> .....	94
4.5.3.	<i>Localización y expresión génica y proteica de las isoformas de la NADPH oxidasa</i> .....	95
4.5.4.	<i>Expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes, producción de peróxido de hidrógeno y expresión de NF-<math>\kappa</math>B y Nrf2</i> .....	97
4.5.5.	<i>Grado de nitrosilación de proteínas</i> .....	98
4.5.6.	<i>Expresión génica y proteica, y grado de fosforilación, de la eNOS</i> .....	99
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>101</b>
5.1.	<i>Características del tratamiento con inhibidores tirosina quinasa. Efectos adversos</i> .....	103
5.2.	<i>Tratamiento con sunitinib en ratas</i> .....	105
5.2.1.	<i>Características generales del modelo experimental</i> .....	105
5.2.2.	<i>Efecto del sunitinib sobre la función vascular. Modificación estructural de la aorta</i> .....	106
5.2.3.	<i>Desbalance oxidativo tras el tratamiento con sunitinib</i> .....	110
5.2.4.	<i>Alteración de la función vascular tras el uso de vesículas extracelulares de animales tratados con sunitinib</i> .....	114
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b> .....	<b>117</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>123</b>



# **ABREVIATURAS**



<b>ACH</b>	Acetilcolina
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>AKT</b>	Serina-treonina quinasa
<b>ALK</b>	Tirosina quinasa
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ARA-II</b>	Bloqueantes del receptor de angiotensina II
<b>ASTV</b>	Área de sección transversal vascular
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CCRM</b>	Carcinoma de células renales metastásico
<b>CE</b>	Células endoteliales
<b>CMLV</b>	Células musculares lisas vasculares
<b>Col1</b>	Colágeno de tipo 1
	<b>Col1<math>\alpha</math>1</b> Colágeno de tipo 1 alfa 1
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>CSF-1R</b>	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i> Receptor del factor estimulador de colonias 1
<b>CYP3A4</b>	Citocromo P450
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCFH</b>	2',7'-diclorodihidrofluoresceína
<b>DHE</b>	Dihidroetidid
<b>ECV</b>	Enfermedad cardiovascular
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>E<sub>máx</sub></b>	Valor de contracción o relajación máxima
<b>eNOS</b>	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> Enzima óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ERN(s)</b>	Especie(s) reactiva(s) de nitrógeno
<b>ERO(s)</b>	Especie(s) reactiva(s) de oxígeno
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FC</b>	Frecuencia cardiaca
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>FGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FLT3</b>	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 receptor</i> Receptor tirosina quinasa 3 tipo Fms
<b>G6P</b>	Glucosa-6-fosfato
<b>G6PDH</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GISTs</b>	<i>Gastrointestinal stromal tumours</i> Tumores del estroma gastrointestinal
<b>GKT136901</b>	Inhibidor de NOX1 y NOX4
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
	<b>Gpx-1/2</b> Glutación peroxidasa 1 y 2
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GTPasa</b>	Guanosina trifosfatasa
<b>HAEC</b>	<i>Human aortic endothelial cells</i> Células endoteliales aórticas humanas

<b>HGFR</b>	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IECA</b>	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IKK</b>	Proteína quinasa I $\kappa$ B
<b>IL-1</b>	Interleuquina-1
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>ILV</b>	<i>Interluminal vesicles</i> Vesículas interluminales
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible
<b>INSR</b>	Receptor de insulina
<b>IP3</b>	Inositol trifosfato
<b>ITQ</b>	Inhibidores de tirosina quinasa
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun N-terminal
<b>Keap1</b>	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
<b>KIT</b>	Receptor del factor de células madre
<b>L-NAME</b>	N( $\omega$ )-nitro-L-arginina metil éster
<b>LEE</b>	Lámina elástica externa
<b>LEI</b>	Lámina elástica interna
<b>LOX</b>	Lipooxigenasa
<b>MAPK/MAPKK</b>	Vía de proteínas quinasas activadas
<b>MB</b>	Membrana basal
<b>MCP-1</b>	Secreción de proteína quimiotáctica de monocitos 1
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>ML171</b>	Inhibidor específico de NOX1
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas de la matriz
<b>mRCC</b>	<i>Metastatic renal cell carcinoma</i> Carcinoma de células renales metastásico
<b>mTOR</b>	Diana de rapamicina en mamífero
<b>MV</b>	Microvesículas
<b>MVB</b>	<i>Multivesicular bodies</i> Cuerpos multivesiculares
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NEDDC</b>	N-1-naftiletilediamida dihidrocloro
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i> Instituto Nacional de Salud
<b>NO</b>	<i>Nitric oxide</i> Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintasa neuronal
<b>NOX(es)</b>	Isoforma(s) de la NADPH oxidasa
<b>NPS</b>	Nitroprusiato sódico
<b>Nrf2</b>	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
<b>NT</b>	Residuos de 3-nitrotirosina
<b>P</b>	Fosforilación
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica

<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> Buffer fosfato salino
<b>PDGFR</b>	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>pEC<sub>50</sub></b>	Logaritmo negativo de la concentración del agonista que produce un 50% de su respuesta máxima
<b>PEG-SOD</b>	SOD conjugada con polietilenglicol
<b>p-eNOS</b>	Enzima óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada
<b>Phe</b>	Fenilefrina
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3 quinasa
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PLA2</b>	Fosfolipasa A2
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLP</b>	Plasma libre de plaquetas
<b>pNET</b>	<i>Pancreatic neuroendocrine tumour</i> Tumor neuroendocrino pancreático
<b>POLDIP2</b>	Proteína 2 que interactúa con la delta polimerasa
<b>RAS</b>	Guanosina trifosfatasa (GTPasas)
<b>RET</b>	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor</i> Receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial
<b>ROCKO</b>	Quinasa asociada a Rho
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> Especies reactivas de oxígeno
<b>RSK</b>	Proteína ribosómica S6 quinasa
<b>RTQ</b>	Receptores de tirosina quinasa
<b>S.E.M</b>	Error estándar de la media
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa <b>SOD-1/-2/-3</b> Superóxido dismutasa 1, 2 y 3
<b>Su</b>	Sunitinib
<b>TEGI</b>	Tumores del estroma gastrointestinal
<b>TGF-β1</b>	Factor de crecimiento transformante β
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> Inhibidores tisulares de MMP
<b>TNEp</b>	Tumores neuroendocrinos pancreáticos
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tsp-1</b>	Trombospondina-1
<b>Ub</b>	Ubiquitina
<b>URL</b>	Unidades relativas de luz
<b>VAS2870</b>	Pan-inhibidor de las isoformas de NOX
<b>VE</b>	Vesículas extracelulares <b>+ VEC</b> Preincubación con VE de ratas control <b>+ VES</b> Preincubación con VE de ratas tratadas con Su
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>α-SMA</b>	<i>Anti-α smooth muscle Actin</i> Anti-α actina de célula muscular lisa



# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**





## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de activación y acción de los receptores tirosina quinasa .....	3
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción de los inhibidores de tirosina quinasa .....	4
<b>Figura 3.</b> Estructura química del sunitinib malato .....	5
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de acción del sunitinib .....	6
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno endógenas	13
<b>Figura 6.</b> Esquema de una célula endotelial y el mecanismo de desacoplamiento de la eNOS. ....	15
<b>Figura 7.</b> Estructura y activación de las isoformas de la NADPH oxidasa.....	17
<b>Figura 8.</b> Representación esquemática de la activación del factor Nrf2 .....	20
<b>Figura 9.</b> Representación esquemática de la activación del factor NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B .....	21
<b>Figura 10.</b> Representación esquemática de un corte transversal de una arteria elástica.....	23
<b>Figura 11.</b> Representación esquemática de los tipos de remodelado vascular.....	26
<b>Figura 12.</b> Esquema ilustrativo sobre la formación de las microvesículas y exosomas .....	33
<b>Figura 13.</b> Instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea .....	55
<b>Figura 14.</b> Baño de órganos compacto de 4 cámaras.....	57
<b>Figura 15.</b> Ganancia de peso al final del tratamiento. Ingesta de comida y de bebida	83
<b>Figura 16.</b> Presión arterial sistólica y diastólica, y frecuencia cardiaca al final del periodo experimental.....	84
<b>Figura 17.</b> Curva dosis-respuesta de vasoconstricción mediada por fenilefrina.....	85
<b>Figura 18.</b> Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por acetilcolina incluida la preincubación durante 30 minutos con ML171 o L-NAME .....	86
<b>Figura 19.</b> Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por nitroprusiato sódico .....	88
<b>Figura 20.</b> Curva dosis-respuesta de vasoconstricción mediada por fenilefrina.....	89
<b>Figura 21.</b> Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por acetilcolina en ausencia y en presencia de vesículas extracelulares. Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por acetilcolina tras la preincubación con NAC .....	90
<b>Figura 22.</b> Tinción hematoxilina-eosina en aortas torácicas .....	92
<b>Figura 23.</b> Tinción tricrómica de Masson. Doble inmunofluorescencia de Col1 $\alpha$ 1 y $\alpha$ -SMA o CD31. Expresión de TGF- $\beta$ 1. Expresión génica de Col1, MMP9 y TIMP1.....	93 y 94
<b>Figura 24.</b> Actividad de la enzima NADPH oxidasa en homogeneizados de aorta. ....	95
<b>Figura 25.</b> Producción de anión superóxido en aortas torácicas.....	96

<b>Figura 26.</b> Doble inmunofluorescencia de NOX1 y $\alpha$ -SMA o CD31. Expresión proteica y génica de NOX1, NOX2 y NOX4.....	98
<b>Figura 27.</b> Expresión proteica y génica de SOD, GR, GPx. Expresión génica de NF- $\kappa$ B y Nrf2. Cuantificación de la producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	100
<b>Figura 28.</b> Expresión proteica de los residuos de 3-nitrotirosina.....	101
<b>Figura 29.</b> Expresión y cuantificación relativa de la expresión proteica de eNOS total, p-eNOS (Ser <sup>1177</sup> ) y p-eNOS (Thr <sup>495</sup> ). Relación p-eNOS (Ser <sup>1177</sup> )/eNOS total y relación p-eNOS (Thr <sup>495</sup> )/ eNOS total. Detección de los niveles de NO .....	102

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados.....	66
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para la inmunodetección de cada anticuerpo .....	68
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de inmunofluorescencia.....	78
<b>Tabla 4.</b> Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $pEC_{50}$ correspondientes a la vasoconstricción inducida por fenilefrina .....	85
<b>Tabla 5.</b> Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $pEC_{50}$ correspondientes a la vasodilatación mediada por acetilcolina en ausencia o en presencia de L-NAME .....	87
<b>Tabla 6.</b> Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $pEC_{50}$ correspondientes a la vasodilatación inducida por nitroprusiato sódico .....	88
<b>Tabla 7.</b> Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $pEC_{50}$ correspondientes a la vasoconstricción inducida por fenilefrina en ausencia y en presencia de vesículas extracelulares .....	89
<b>Tabla 8.</b> Valores de $E_{m\acute{a}x}$ y $pEC_{50}$ correspondientes a la vasodilatación mediada por acetilcolina previa incubación con vesículas extracelulares, en ausencia y en presencia de NAC .....	91



***ABSTRACT***



Sunitinib (Su) is an orally active multitarget tyrosine kinase inhibitor with antiangiogenic and antineoplastic effects. Su is the first-line choice for metastatic renal cell carcinoma treatment (mRCC) and the second-line one for gastrointestinal stromal tumours (GISTs) and pancreatic neuroendocrine tumour (pNET). The drug binds to several tyrosine kinase receptors including platelet-derived growth factor receptor, PDGFR  $\alpha/\beta$ ; colony stimulating factor 1 receptor, CSF-1R; stem cell factor receptor, KIT; Fms-like tyrosine kinase 3 receptor, FLT3; vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR-1/2/3; and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor, RET.

Arterial hypertension is a common feature associated to treatment with Su and other VEGFR inhibitors. Several mechanisms have been suggested to explain this side effect, e.g., reduced nitric oxide generation, endothelial dysfunction, capillary rarefaction or endothelin-1 overexpression. However, the precise underlying pathophysiological mechanisms remain unknown.

The aim of this doctoral thesis was to deepen our understanding on those mechanisms involved in the development of Su-dependent hypertension. To this purpose, our experimental approach focused on the study of vascular function, including assays in the presence or absence of circulating extracellular vesicles. In addition, vascular remodelling, fibrosis and inflammation, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase), oxidative stress and nitric oxide systems were evaluated in thoracic aortas obtained from male Wistar rats treated with Su for 3 weeks.

Our results showed increased blood pressure and reduced endothelium-dependent vasodilation in animals subjected to Su treatment, the latter being reverted by NADPH oxidase blockade. Interestingly, reduced endothelium-dependent vasodilation was also observed in aortic rings of normotensive rats preincubated with circulating extracellular vesicles from Su-treated rats, which was reverted by oxidative blockade. Further alterations observed in aortas from Su-treated animals included vascular remodelling and stronger Masson trichrome staining, together with enhanced immunofluorescence signal for collagen 1 alpha 1 (Col1 $\alpha$ 1).

These results were accompanied by a significant elevation in superoxide anion production and in the activity/protein/gene expression of NADPH oxidase isoforms (NOX1, NOX2 and NOX4), which could be prevented by NOX inhibition. Su-treated animals also presented with NOX-dependent eNOS inactivation and decreased aortic NO levels.

All these observations indicate that endothelial dysfunction secondary to enhanced oxidative stress and changes in vascular remodelling might be responsible for the establishment of arterial hypertension that typically occurs following treatment with Su.

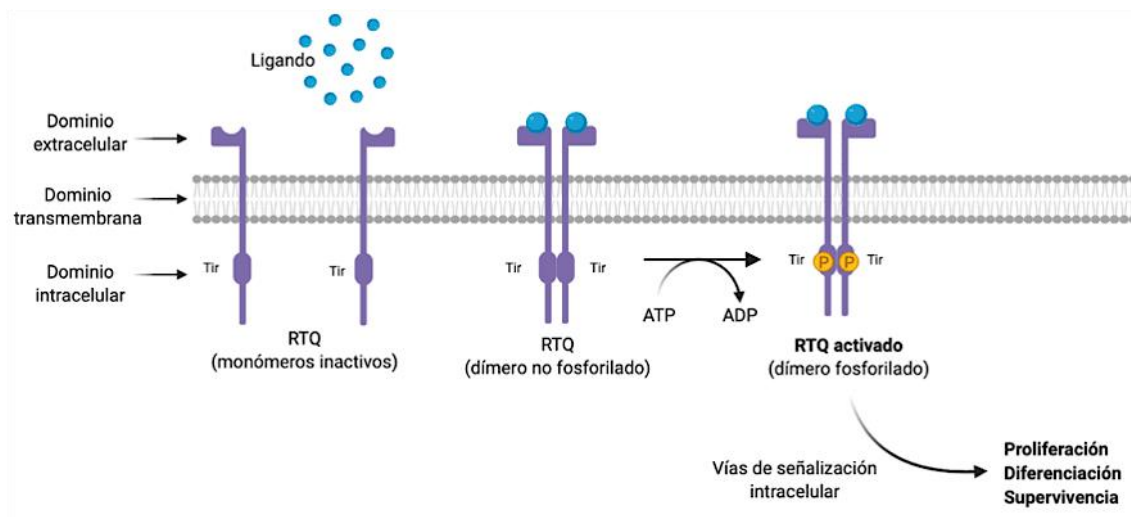


# **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. Receptores e inhibidores de tirosina quinasa.

Los **receptores de tirosina quinasa (RTQ)** se localizan en la superficie celular y son componentes esenciales de las vías de transmisión de señales que median la comunicación de célula a célula. La estructura de un RTQ consta de un dominio extracelular (donde se unen los ligandos o moléculas señal), un dominio transmembrana hidrofóbico, y un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Figura 1). Generalmente, los RTQ se activan mediante dimerización inducida por ligando, facilitando la autofosforilación e induciendo cambios conformacionales que sirven para estabilizar el estado activo de la quinasa. Esta activación del receptor desencadena las vías de señalización intracelular que promueven los diferentes procesos celulares, tales como la proliferación, diferenciación y supervivencia <sup>1</sup> (Figura 1).



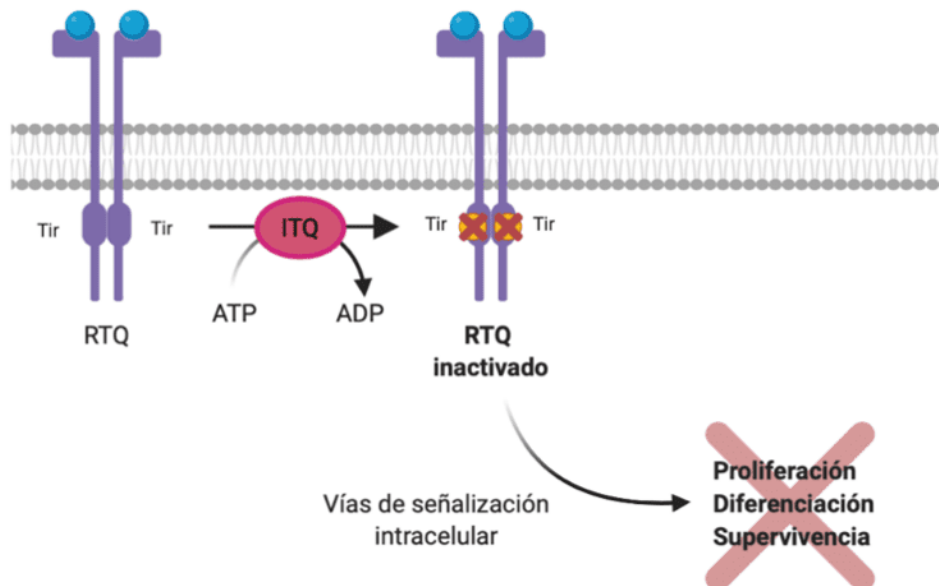
**Figura 1.** Mecanismo de activación y acción de los receptores de tirosina quinasa (RTQ). Dominio tirosina quinasa (Tir). Fosforilación(P).

Se han descrito al menos 90 genes que codifican proteínas con actividad tirosina quinasa. De estos, 58 codifican receptores divididos en 20 clases, que están fuertemente asociados con enfermedades oncológicas; entre ellos se encuentran: el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR (clase I); el receptor de insulina, INSR (clase II); el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGFR

(clase III); el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, FGFR (clase IV); el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGFR (clase V); y el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, HGFR (clase VI) <sup>2</sup>.

El hecho de que estos receptores desempeñen papeles claves en procesos celulares tales como el crecimiento, la diferenciación, el metabolismo o la supervivencia, hace que muchos de ellos estén implicados en la aparición o progresión de varios tipos de cánceres, ya sea a través de mutaciones del receptor o por sobreexpresión del receptor/ligando <sup>3</sup>.

Con objeto de desregular las vías de señalización intracelular en el cáncer, desde hace algo más de dos décadas se vienen desarrollando los fármacos denominados **inhibidores de tirosina quinasa (ITQ)**. Los ITQ compiten con el ATP por la unión al dominio intracelular con actividad tirosina quinasa del receptor, impidiendo su autofosforilación y bloqueando así las vías de señalización intracelular que promueven en última instancia la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células tumorales (Figura 2).

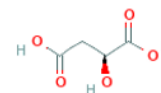


**Figura 2.** Mecanismo de acción de los inhibidores de tirosina quinasa (ITQ).  
Receptor de tirosina quinasa (RTQ). Dominio tirosina quinasa (Tir).

Actualmente, y según la información obtenida del Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud para la Metodología de Estadísticas de Medicamentos (*World Health Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology*, WHOCC), existen alrededor de 50 principios activos que actúan inhibiendo directamente las proteínas con actividad tirosina quinasa y los ligandos que las activan, encontrándose entre ellos el imatinib, gefitinib, sorafenib y sunitinib<sup>4</sup>.

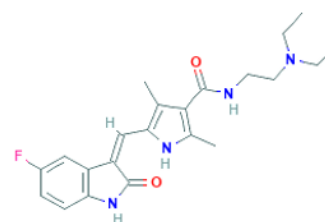
## 1.2. Sunitinib. Mecanismo de acción.

El sunitinib (Su; fármaco comercializado en forma de L-malato de sunitinib) se denomina, atendiendo a su fórmula química, como la sal (1:1) del ácido 2(S)-hidroxibutanodioico (ácido L-málico) con la N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-2-oxo-1H-indol-3-iliden)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3- carboxamida (Figura 3).

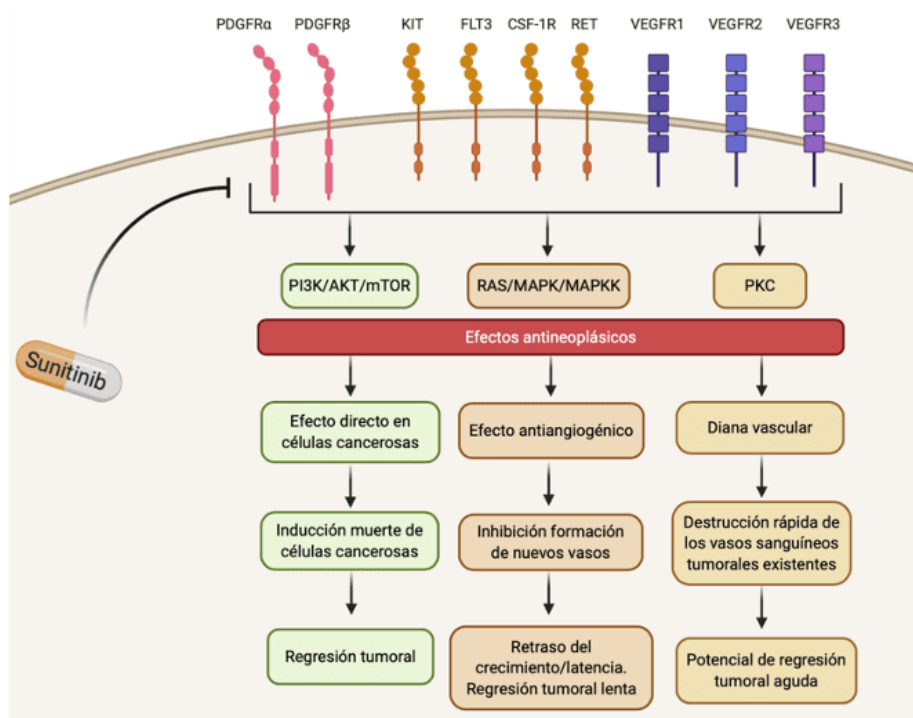


**Figura 3.** Estructura química del sunitinib malato.

Tomado de PubChem, National Institutes of Health (NIH).



Este compuesto actúa como agente antineoplásico inhibiendo las vías de señalización intracelular por unión a múltiples receptores tirosina quinasa<sup>3</sup>. Por ello, esta molécula pertenece al grupo de los inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) previamente descrito. Concretamente, el Su es un inhibidor de los siguientes receptores: PDGFR  $\alpha/\beta$ ; receptor del factor estimulador de colonias, CSF-1R; receptor del factor de células madre, KIT; receptor tirosina quinasa 3 tipo Fms, FLT3; VEGFR-1, 2 y 3; y receptor del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, RET. Algunos de estos receptores están implicados en la angiogénesis y la progresión metastásica del cáncer, por lo que además de ser un agente antineoplásico, el Su se considera un agente antiangiogénico (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de acción del sunitinib. Las rutas bioquímicas implicadas son: fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K)/serina-treonina quinasa (AKT), diana de rapamicina en mamífero (mTOR); Guanosina trifosfatasas (GTPasas, RAS), vía de proteínas quinazas activadas (MAPK/MAPKK), y proteína quinasa C (PKC).

### 1.2.1. Indicaciones terapéuticas. Propiedades farmacocinéticas.

En año 2006, la administración estadounidense con competencias sobre medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) aprobó el uso de sunitinib para el tratamiento de primera línea en adultos que presentan carcinoma de células renales metastásico (CCRM); tumores neuroendocrinos pancreáticos (TNEp) bien diferenciados, no resecables o metastásicos; y como tratamiento de segunda línea cuando existe resistencia o intolerancia al tratamiento de primera línea con imatinib en tumores malignos no resecables y/o metastásicos del estroma gastrointestinal (TEGI)<sup>56</sup>. El Su se administra por vía oral y se absorbe fácilmente en el tracto digestivo, con una buena biodisponibilidad y una cinética lineal a dosis clínicamente relevantes. Las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{m\acute{a}x}$ ) se observan generalmente entre las 6 y 12 horas ( $T_{m\acute{a}x}$ ) después de la administración oral. Se metaboliza principalmente a través

del citocromo P450 (CYP3A4), por lo que hay que tener especial precaución cuando se administra con otros fármacos inhibidores o inductores de esta enzima. La vida media del fármaco permite que su administración sea de una sola dosis diaria, y su principal vía de eliminación es a través de las heces <sup>7</sup>.

### **1.2.2. Efectos adversos. Toxicidad cardiovascular e hipertensión arterial inducida por sunitinib.**

Pese a su alta efectividad, los tratamientos con ITQ no están exentos de provocar **efectos adversos**, como es natural. En concreto, el tratamiento con Su se ha asociado con la aparición de una amplia variedad de efectos no deseados, siendo los más frecuentes: fatiga, diarrea, eritrodisestesia palmoplantar (“síndrome mano-pie”), decoloración de la piel y alteraciones hematológicas (leucopenia, anemia y trombocitopenia); también destacan la cardiotoxicidad y la hipertensión arterial (HTA) <sup>8,9</sup>.

No todos los ITQ producen los mismos efectos adversos. Según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), el gefitinib no produce cardiotoxicidad o HTA, y el imatinib puede provocar HTA pero de manera poco frecuente. Por el contrario, el uso de sorafenib o de Su, claramente produce efectos cardiotóxicos e HTA <sup>10-12</sup>.

Dentro de los **efectos cardiotóxicos** que produce el Su, podemos observar una prolongación asintomática del intervalo QT, reducción de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardiaca congestiva, síndromes coronarios agudos, infarto agudo de miocardio y, como indicamos anteriormente, HTA <sup>13,14</sup>. Varios estudios han indicado una alta incidencia de reacciones adversas en el tratamiento con Su. En este sentido, podemos destacar un estudio realizado en pacientes con CCRM tratados con este principio activo, observándose efectos cardiovasculares adversos como la HTA en todos sus grados (15-34% de los pacientes), edema periférico (24%), disminución en

la fracción de eyección (11-16% de los pacientes), insuficiencia cardiaca (15% de los pacientes) y dolor torácico (13% de los pacientes) <sup>13</sup>.

En un estudio reciente realizado en pacientes con carcinoma hepatocelular tratados con sorafenib o Su, y pacientes con TEGI tratados con imatinib o Su, se observó una incidencia mayor al 80% de efectos adversos para los diferentes tratamientos; siendo el tratamiento con Su el que se asoció con una mayor proporción de efectos adversos de grado  $\geq 3$  ; esta clasificación, según el *National Cancer Institute Common Toxicity Criteria*, significa que el Su produce eventos adversos graves e indeseables potencialmente mortales o incapacitantes <sup>15</sup>.

La HTA, definida como valores de presión arterial sistólica iguales o superiores a 140 mm Hg y/o valores de presión arterial diastólica iguales o superiores a 90 mm Hg, es un claro efecto no deseado inducido por la terapia con Su. A nivel clínico, curiosamente, la aparición de HTA se emplea como biomarcador de la eficiencia antineoplásica del fármaco. Así, en pacientes con CCRM se ha visto que la HTA asociada al tratamiento con Su, a su vez se asocia con mejores resultados clínicos <sup>16</sup>. En un análisis retrospectivo llevado a cabo por Goldstein y cols. <sup>17</sup> en pacientes con CCRM tratados con Su, se observó que los pacientes que desarrollaron hipertensión arterial sistólica o diastólica presentaron una mejor supervivencia sin progresión<sup>1</sup> y supervivencia general<sup>2</sup> frente a los pacientes que no desarrollaron hipertensión <sup>17</sup>. El tratamiento de otros fármacos antagonistas de VEGFR, como el axitinib y pazopanib, también mostró resultados similares a los indicados con el Su <sup>10</sup>.

Es lógico deducir, por lo tanto, que aquellos pacientes que inicien una terapia con ITQ deben tener controlada la presión arterial, y en caso de que los pacientes sean

---

<sup>1</sup> *Período de tiempo durante el tratamiento y después del mismo en que el paciente de una enfermedad, como el cáncer, permanece vivo y la enfermedad no empeora. En un estudio o ensayo clínico, medir la supervivencia sin progresión es una manera de determinar la eficacia de un tratamiento nuevo.*

<sup>2</sup> *Porcentaje de personas en un estudio o grupo de tratamiento que todavía están vivas durante un determinado período después del diagnóstico o del inicio del tratamiento de una enfermedad como el cáncer. A menudo, la tasa de supervivencia general se indica como una tasa de supervivencia a 5 años, que es el porcentaje de personas en un estudio o grupo de tratamiento que están vivas cinco años después de su diagnóstico o del comienzo del tratamiento.*



hipertensos, estos deben estar sometidos a terapia antihipertensiva antes de comenzar el tratamiento con antineoplásicos <sup>18</sup>.

En general, el control de la HTA puede abordarse bajo una perspectiva no farmacológica y mediante terapia farmacológica. La terapia no farmacológica implica cambios en el estilo de vida, a través de una alimentación saludable, un menor consumo de sal y alcohol, una normalización del índice de masa corporal, evitar el consumo de tabaco y promover el ejercicio físico. Si aun así no se observa ningún cambio después de 6 meses, se procedería a la terapia farmacológica <sup>18</sup>.

Los tratamientos para la HTA inducida por ITQ son los mismos que para el tratamiento de la hipertensión esencial. Se ha sugerido como tratamiento de elección los inhibidores del sistema renina-angiotensina (como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II), debido a que presentan efectos beneficiosos sobre la expresión del inhibidor del plasminógeno-1 y la proteinuria, además de aumentar la liberación de óxido nítrico (NO) endotelial <sup>7</sup>. En un estudio retrospectivo en 213 pacientes con CCRM que recibieron Su y/o algún IECA/ARA-II, se demostró que aquellos pacientes que recibieron tratamiento antihipertensivo antes o durante un ciclo de Su, tuvieron un aumento significativo tanto en la supervivencia general como en la supervivencia libre de progresión, con respecto a los que no habían tomado IECA/ARA-II <sup>19</sup>.

En cuanto al tratamiento con los bloqueantes de los canales de calcio no dihidropiridínicos, como el verapamilo o el diltiazem (ambos inhibidores del CYP3A4), pueden conducir a interacciones farmacológicas con agentes quimioterapéuticos metabolizados por la vía del citocromo P450, como el Su y sorafenib. Por último, existen pocos datos clínicos que analicen el efecto de la terapia con betabloqueantes en la HTA inducida por inhibición de VEGFR <sup>7</sup>.

### **1.2.3. Mecanismos etiopatogénicos subyacentes al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa.**

Se han sugerido varios mecanismos para explicar el desarrollo de la cardiotoxicidad y la HTA producidas por el tratamiento de los ITQ, aunque este sigue siendo tema de debate en el ámbito científico. Entre las teorías más relevantes cabe destacar:

- a) *Inhibición de la vía del NO.* El VEGF aumenta la transcripción de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), y por ende la producción de NO (potente vasodilatador). Por ello, una inhibición de la vía de señalización del VEGF y una reducción en la generación de NO produciría vasoconstricción, disfunción endotelial y rarefacción capilar, factores involucrados en la HTA inducida por los ITQ <sup>9,20</sup>.
  
- b) *Presencia de estrés oxidativo.* La señalización a través de VEGF protege a las células del estrés oxidativo y del daño endotelial ejercido por las especies reactivas de oxígeno (ERO), en parte a través de la activación de enzimas antioxidantes reguladas por el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2) <sup>21</sup>. Es por ello que, de manera fisiológica, para reducir este daño se aumenta la producción de VEGF y VEGFR en la vasculatura <sup>22</sup>. Se ha demostrado que el aumento del estrés oxidativo es una de las alteraciones relevantes tras el tratamiento con Su <sup>23,24</sup>, confiriendo un papel importante a las ERO, al sistema nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido oxidasa (NADPH oxidasa, enzima productora de anión superóxido), y a las enzimas antioxidantes, todos ellos entendidos como factores implicados en la HTA y cardiotoxicidad inducidas por los ITQ <sup>21</sup>.

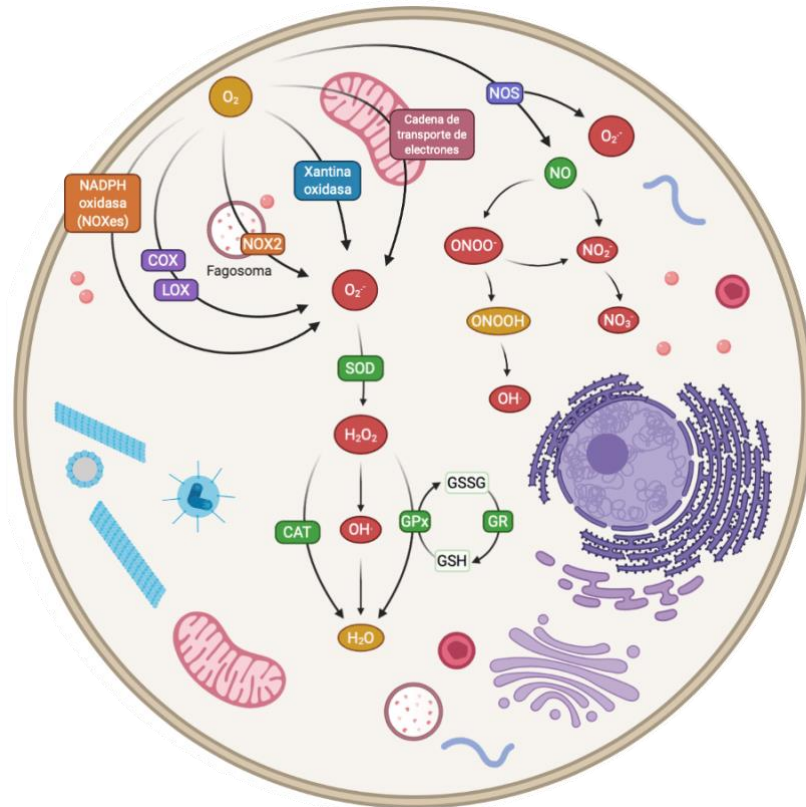
- c) *Sistema de endotelina-1 (ET-1)*. Existe cierta discrepancia con respecto al papel que desempeña la endotelina en el desarrollo de la HTA inducida tras el uso de ITQ. Se ha demostrado tanto en animales como en pacientes, que el sistema ET-1 juega un papel importante en el desarrollo de la HTA inducida por Su <sup>25</sup>. Estudios recientes con macitentan (antagonista de los receptores de ET-1) muestran una disminución de la presión arterial tras el tratamiento con Su. Sin embargo, este fármaco no está actualmente indicado para el tratamiento de la HTA sistémica, sino para la HTA pulmonar, y la combinación de macitentan y Su debe evitarse debido a que produce una interacción farmacocinética no deseada <sup>26</sup>. En el caso de otro ITQ como cediranib, su administración concomitante con otro antagonista de los receptores de ET-1 (bosentan) no produjo ninguna atenuación significativa en el aumento observado en la presión arterial <sup>27</sup>.
- d) *Complicaciones vasculares*. La presencia de rigidez, los cambios en las propiedades mecánicas y la fibrosis en las grandes arterias están involucrados en el aumento de la presión arterial secundaria al tratamiento con ITQ <sup>13,15,23</sup>. Además, se ha sugerido que la vasoconstricción local en áreas específicas podría ser responsable del inicio de la HTA <sup>27</sup>.
- e) *Disfunción mitocondrial*. Las disfunciones mitocondriales desempeñan un papel destacado en la patogénesis de diversas enfermedades y en los efectos secundarios cardiopatóxicos de varios medicamentos. La toxicidad del Su se asocia principalmente con el deterioro de las mitocondrias, tratándose de un proceso reversible. El papel de la proteína quinasa MAPK, es esencial para mantener la homeostasis de la energía cardíaca; por tanto, la interrupción inducida por Su de la señalización de MAPK podría explicar la disfunción cardíaca observada. El Su afecta la homeostasis de la energía celular, ya que al interrumpir la vía de MAPK induce la apertura de poros de transición de

permeabilidad mitocondriales, disipa el potencial de membrana mitocondrial, las crestas se ven interrumpidas y hay una disminución masiva de ATP intracelular. También se ha sugerido que el Su puede aumentar el flujo autofágico o el proceso metabólico de degradación de sustancias, debido a que podría inhibir la proteína ribosómica S6 quinasa (RSK), activando así al factor pro-apoptótico Bad, acompañado de una baja liberación de citocromo c y apoptosis <sup>14</sup>.

### **1.3. Estrés oxidativo. Implicaciones en el sistema cardiovascular.**

Las **especies reactivas de oxígeno** (ERO) son un grupo de pequeñas moléculas reactivas cuyo origen puede ser endógeno, formadas durante procesos bioquímicos en orgánulos celulares como la mitocondria, el retículo endoplasmático o los peroxisomas <sup>28,29</sup>; o exógeno, debido a una exposición a agentes dañinos, como contaminantes ambientales, radiación, tabaco, etc. Las ERO desempeñan papeles críticos en la regulación de diversas funciones celulares y procesos biológicos, siendo importantes en la respuesta inflamatoria, apoptótica, en el crecimiento celular o en la regulación del tono vascular <sup>30</sup>.

El equilibrio entre las moléculas de óxido-reducción (entendido generalmente como equilibrio redox), es importante para preservar las funciones vitales celulares. Sin embargo, la excesiva producción de las especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERO/ERN) y/o la disfunción en los sistemas antioxidantes del organismo, dañan todas las biomoléculas (lípidos, azúcares, proteínas y polinucleótidos) <sup>31</sup>, apareciendo un desequilibrio entre estos factores prooxidantes y antioxidantes que puede desencadenar el llamado **estrés oxidativo** <sup>32</sup>. A nivel celular, podemos encontrar diferentes tipos de ERO/ERN que a su vez interaccionan entre ellas dando lugar a diversos productos. En la Figura 5 representamos las diferentes ERO/ERN, así como el papel de las distintas enzimas antioxidantes.



**Figura 5.** Metabolismo de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno endógenas.

Moléculas: oxígeno ( $O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo (OH), nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), peroxinitrito ( $OONO^-$ ), ácido peroxinitroso (ONOOH), glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG). Enzimas: ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa (LOX), isoforma de NADPH oxidasa (NOX2), óxido nítrico sintasa (NOS), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx).

Entre las distintas ERO podemos encontrar el **anión superóxido** ( $O_2^-$ ), el cual se forma cuando el oxígeno que no ha sido consumido y reducido a agua acepta un electrón. La producción de  $O_2^-$  puede darse mediante la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, la NADPH oxidasa (NOXes), la ciclooxigenasa (COX), la lipooxigenasa (LOX), la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa (NOS) en su estado desacoplado<sup>33</sup>. El  $O_2^-$  es incapaz de atravesar libremente la membrana celular, excepto a través de canales iónicos, y presenta una vida media corta e inestable, de modo que experimenta una rápida reducción a **peróxido de hidrógeno** ( $H_2O_2$ ) por la acción de la

enzima superóxido dismutasa (SOD<sup>3</sup>). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene una vida media más larga, siendo relativamente estable y difundiendo fácilmente entre las células. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser convertido en el **radical hidroxilo** (OH<sup>·</sup>) por una reacción en cadena con otras moléculas que inducen efectos tóxicos. El OH<sup>·</sup> es altamente oxidante, electrofílico, tóxico y de vida media muy corta, siendo una molécula que reacciona muy cerca de su sitio de formación <sup>33</sup>.

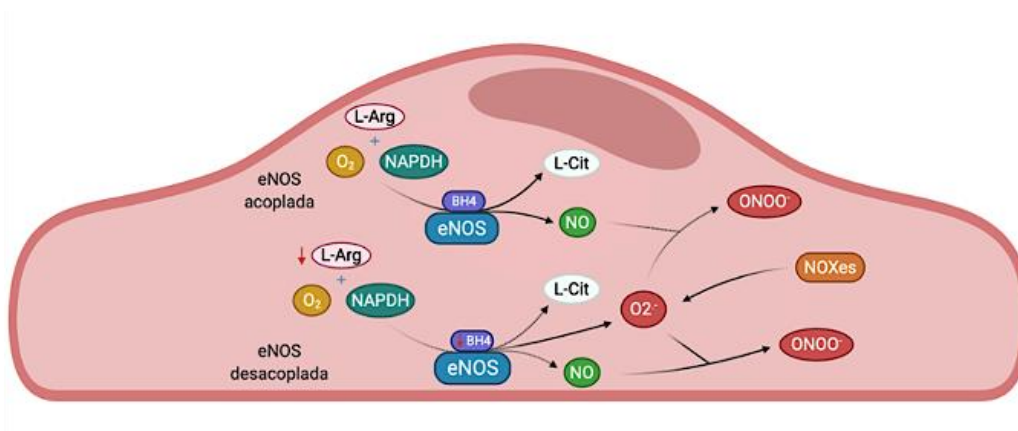
El **óxido nítrico** (NO) es otro radical de vida media muy corta, y su oxidación da lugar a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). El NO desempeña un papel muy importante en el sistema vascular, ya que es la principal sustancia vasodilatadora liberada por el endotelio vascular para regular el flujo y la presión sanguínea. Es sintetizado por la familia de las NOS<sup>4</sup>, que catalizan la producción de NO y citrulina a partir de los sustratos, O<sub>2</sub> y L-arginina (Figura 6). Sin embargo, en circunstancias particulares, como la disponibilidad limitada de los sustratos y/o cofactores como NADPH o la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), la NOS puede generar O<sub>2</sub><sup>-</sup> en lugar de NO, una condición conocida como **“desacoplamiento de la NOS”** que supone una reducción en la biodisponibilidad del NO (Figura 6). El desacople puede darse en la NOS endotelial, ocasionando un deterioro en la función endotelial o **disfunción endotelial**, proceso frecuente en la presencia de estrés oxidativo que generalmente produce una disminución en la vasodilatación dependiente de endotelio <sup>33</sup>. El NO también puede reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> para generar **peroxinitrito** (ONOO<sup>-</sup>), el cual es considerado como un potente oxidante, bastante estable, que difunde muy bien entre las células. En condiciones patológicas, los niveles de ONOO<sup>-</sup> están aumentados, de modo que este

---

<sup>3</sup> Hay tres isoformas de SOD localizadas en diferentes compartimentos celulares: una superóxido dismutasa de cobre-zinc citosólica (SOD-1 o CuZnSOD), una superóxido dismutasa de manganeso predominantemente mitocondrial (SOD-2 o MnSOD) y una CuZnSOD extracelular (SOD-3) con afinidad por proteoglicanos de heparina sulfato en la superficie celular.

<sup>4</sup> En mamíferos existen tres isoformas de la NOS: la NOS1 o nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal), la NOS2 o iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y la NOS3 o eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial). La nNOS y la eNOS son expresadas constitutivamente como enzimas latentes y requieren una alta concentración de calcio para ser funcionales, a diferencia de la iNOS que es inducible e independiente de calcio.

anión reacciona con los residuos de tirosina dando lugar a nitrotirosina, producto considerado como un marcador de estrés oxidativo <sup>34</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de una célula endotelial y el mecanismo de desacoplamiento de la eNOS. L-Arginina (L-Arg), L-Citrulina (L-Cit), tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). La eNOS desacoplada produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO en menor medida, ambos pueden reaccionar produciendo ONOO<sup>-</sup>. A su vez, las isoformas de la NADPH oxidasa o NOXes también producen O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el cual puede reaccionar con el NO de la eNOS (acoplada y desacoplada) y producir ONOO<sup>-</sup>.

Como se indicó previamente, las ERO ejercen un papel fundamental en la fisiología celular. En el sistema cardiovascular, son importantes en la regulación fisiológica del tono vascular y en el crecimiento, adhesión, diferenciación, senescencia y apoptosis celular. Sin embargo, los niveles excesivos de ERO pueden estar asociados con el desarrollo de varias enfermedades cardiovasculares, estando implicados en diferentes procesos patológicos tales como la disfunción endotelial, inflamación, proliferación y migración de células de la musculatura lisa vascular, conduciendo a la remodelación vascular <sup>35</sup>.

### **1.3.1. Sistema NADPH oxidasa. Implicación en el desarrollo de la hipertensión arterial.**

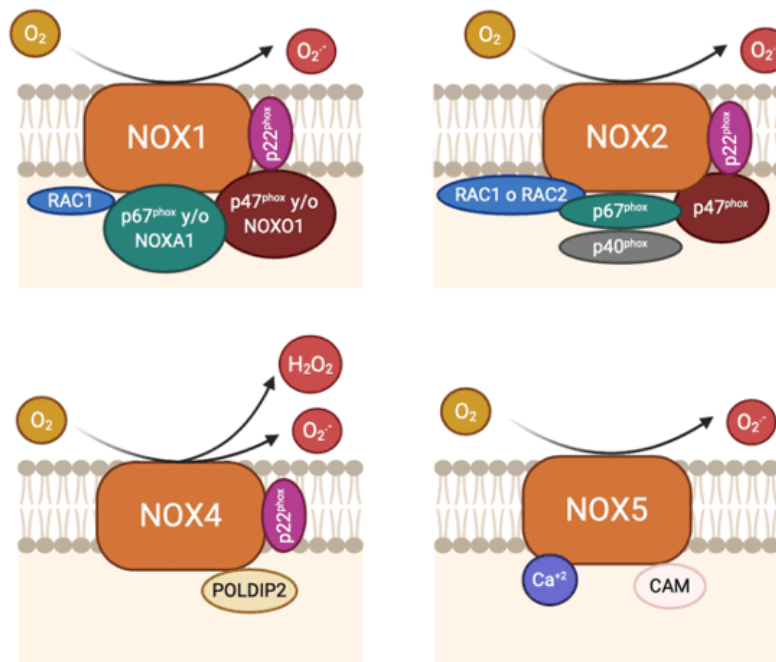
La NADPH oxidasa es una de las principales fuentes de  $O_2^-$  en el sistema cardiovascular, siendo responsable de la reducción en la biodisponibilidad de NO vascular y de la producción de ERO endotelial y vascular <sup>36</sup>. La primera isoforma de la familia NADPH oxidasa estudiada fue la NOX2, implicada en la respuesta oxidativa de los macrófagos frente a la invasión de microorganismos <sup>37</sup>.

En la actualidad, se conoce que la NADPH oxidasa se expresa en diversos tipos celulares, además de en células fagocíticas. Se han caracterizado siete isoformas en mamíferos, NOX1-5 y las oxidasas duales DUOX1 y 2. Además, la enzima cuenta con subunidades reguladoras citosólicas, p47<sup>phox</sup> o NOXO1, p67<sup>phox</sup> o NOXA1, p40<sup>phox</sup>, RAC1 y RAC2; y la subunidad reguladora transmembrana, p22<sup>phox</sup>; siendo todas estas subunidades esenciales para la funcionalidad de la enzima. Cabe señalar que NOX3 sólo se expresa en tejido fetal y oído interno, y NOX5 sólo se expresa en células humanas <sup>38</sup>.

El mecanismo de activación enzimática varía dependiendo de la NOX estudiada. En condiciones de reposo, NOX2 y p22<sup>phox</sup> se encuentran como un complejo inactivo anclado a la membrana, mientras que p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y p40<sup>phox</sup> se encuentran en el citosol. La activación de la enzima requiere que la GTPasa RAC1 o RAC2 se ensamble a NOX2. A continuación, se recluta a la proteína quinasa C (PKC) para que fosforile a p47<sup>phox</sup>, lo que conduce a un cambio conformacional en la estructura de p47<sup>phox</sup> permitiendo la interacción con p22<sup>phox</sup> y activándose finalmente NOX2. En los casos de NOX1 y 3, son activadas mediante el mecanismo descrito anteriormente, salvo que las subunidades citosólicas, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> pueden ser sustituidas por subunidades homólogas NOXO1 y NOXA1, respectivamente. La activación de NOX4 precisa de p22<sup>phox</sup>. En células musculares lisas vasculares, se ha demostrado que la proteína 2 que interactúa con la delta polimerasa (POLDIP2) se asocia con p22<sup>phox</sup> para regular la



actividad de NOX4. Por su parte, NOX5 es la única isoforma que contiene un dominio de calmodulina (CAM) modulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura y activación de las isoformas de la NADPH oxidasa en el sistema cardiovascular humano. NOX 1, 2, 4 y 5: isoformas de la NADPH oxidasa. RAC 1-2 (GTPasas). p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, NOXO1, p67<sup>phox</sup>, NOXA1, p40<sup>phox</sup>: subunidades reguladoras citosólicas. Proteína 2 que interactúa con la delta polimerasa (POLDIP2). Calmodulina (CAM). Moléculas: oxígeno ( $\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), catión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

Dependiendo de la isoforma, la NADPH oxidasa puede ejercer diversas funciones, como son la biosíntesis de algunas hormonas, formación de la matriz extracelular, así como la señalización redox<sup>39</sup>. En el sistema cardiovascular humano sólo se expresan las isoformas NOX1, 2, 4 y 5, y la localización celular de las mismas varía en función del tipo de célula. En el caso de roedores, en el sistema cardiovascular se expresan únicamente las isoformas NOX1, 2 y 4<sup>36</sup>.

Se han descrito muchos agonistas implicados en la activación de la enzima NADPH oxidasa en el sistema cardiovascular, incluyendo factores de crecimiento (PDGF, EGF y factor de crecimiento transformante  $\beta$ , TGF- $\beta$ 1), citoquinas (interleuquina-1, IL-1), factor de agregación plaquetaria, fuerzas mecánicas (fuerzas de

cizallamiento, flujo laminar u oscilatorio de la sangre), factores metabólicos (hiperglucemia, hiperinsulinemia, ácidos grasos libres y productos finales de glicación avanzada) y agonistas de receptores acoplados a proteínas G (serotonina, trombina, bradiquinina, endotelina y angiotensina II (Ang II). También se ha demostrado la activación de la enzima por otras proteínas como la proteína tirosina quinasa Src, RAC1, PKC, fosfolipasa D (PLD1) y fosfolipasa A2 (PLA2). En condiciones fisiológicas, los niveles de actividad de la enzima NADPH oxidasa son bajos. Sin embargo, la hiperactivación enzimática puede aparecer en presencia de factores de riesgo cardiovasculares, como son la aterosclerosis, diabetes, obesidad, hipertensión arterial e hipoxia <sup>40</sup>.

En una reciente revisión de Burtenshaw D y cols. <sup>41</sup> se detallan la localización y funcionalidad de las diferentes NOXes dentro de la estructura de la pared vascular. En condiciones fisiológicas, las células endoteliales (CE) expresan niveles relativamente bajos de NOX 1, 2, 4 y 5, siendo predominante la NOX4. NOX 1, 2, 4 y 5 se localizan en la membrana del retículo endoplásmico y en el núcleo, donde participan en la señalización redox intracelular. En condiciones patológicas, la sobreexpresión de NOX1, 2 y 5 promueve disfunción endotelial, inflamación, y apoptosis dentro de la pared del vaso. Sin embargo, la sobreexpresión de NOX4 parece ejercer un efecto compensatorio o protector, aumentando la biodisponibilidad de NO y suprimiendo las vías apoptóticas.

En las células musculares lisas vasculares (CMLV), las vías de señalización intracelular responsables de la generación de ERO aún no están claras; pero se sabe que estas células expresan NOX 1, 2, 4 y 5 (siendo predominantes las isoformas 1 y 4). Las distintas NOXes pueden diferir en su actividad, respuesta a estímulos y tipo de ERO liberada. Por ejemplo, NOX1 está implicada en la migración de las CMLV. Recientemente se ha descubierto que una chaperona de bajo peso molecular, la ciclofilina A, es secretada por las CMLV en respuesta a ERO y estimula la proliferación de CMLV y la migración de células inflamatorias. Las concentraciones excesivas de NOX4 en CMLV pueden inducir inflamación, fibrosis, apoptosis e incluso necrosis, ya

que, bajo ciertas condiciones, como puede ser la liberación del TGF- $\beta$ 1, diabetes o insuficiencia cardíaca, la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente de NOX4 puede volverse dañina <sup>41</sup>.

Por lo que respecta a las células de la capa externa vascular o túnica adventicia, principalmente fibroblastos y células madre, estas expresan NOX 1, 2, 4 y 5, siendo en este caso predominante la NOX4 en fibroblastos y la NOX2 en células madre. NOX2 y p22<sup>phox</sup> son predominantes en la adventicia de los vasos hipertensivos, promoviendo la secreción de proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) e interleuquina-6 (IL-6). Por todo ello, se considera que las ERO derivadas de las NOX 1, 2, 4 y 5 parecen estar implicadas en el deterioro de la función vascular y promueven la remodelación vascular <sup>41</sup>.

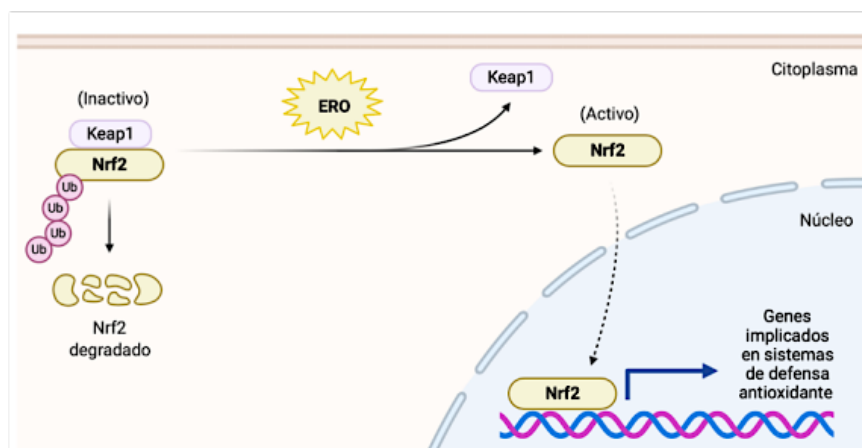
La HTA fue una de las primeras patologías en las que se demostró claramente la implicación de la enzima NADPH oxidasa <sup>42</sup>. En modelos animales hipertensos inducidos mediante Ang II se observó un aumento en los niveles de las ERO a través de la activación de la NADPH oxidasa no fagocítica <sup>43</sup>, sugiriendo que el desarrollo de la HTA se asocia con un incremento del estrés oxidativo mediado por la activación de la enzima. Un ejemplo de esto se manifiesta en el incremento a nivel génico de NOX1-4 observado en aortas de animales tratados con Ang II <sup>36</sup>.

Es bien sabido que el desarrollo de **eventos inflamatorios** está íntimamente ligado a diferentes estímulos, entre los que se encuentran aquellos vinculados al estrés oxidativo y la producción de ERO generada por la activación de las NADPH oxidasa. Por ejemplo, en el desarrollo de la aterosclerosis, la inflamación vascular es un factor clave; y mediante el bloqueo de las citoquinas proinflamatorias se puede reducir el desarrollo de esta enfermedad, considerada como patología inflamatoria de índole crónico en la que juega un papel esencial las ERO y el NO, los cuales están presentes en el inicio y en la propagación de la aterosclerosis <sup>44,45</sup>.

En la inflamación se ven implicados dos factores de transcripción, Nrf2 y NF- $\kappa$ B. La activación de Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2) afecta

directamente a la homeostasis de las ERO, ya que actúa regulando los sistemas de defensa antioxidantes. En condiciones normales, Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) induce a una rápida ubiquitinación y degradación de Nrf2, suprimiendo su actividad transcripcional. Sin embargo, bajo estrés oxidativo, se modifican los residuos de cisteinilo específicos de Keap1, perdiendo su capacidad de ubiquitinar Nrf2 y permitiendo la acumulación de Nrf2 en el núcleo y el aumento de la expresión de sus genes diana <sup>46</sup> (Figura 8).

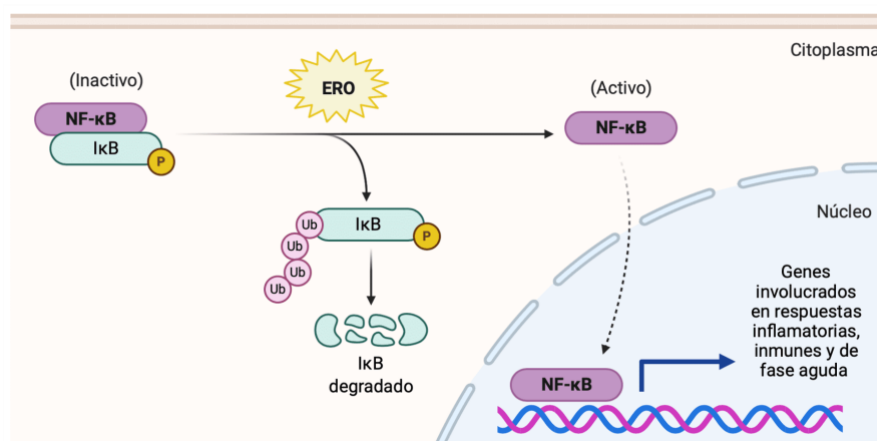
Se ha observado en modelos experimentales de hipertensión inducida, que el sistema de defensa antioxidante Nrf2 es insuficiente para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, posiblemente debido a niveles elevados de represores Nrf2 en animales hipertensos <sup>47</sup>.



**Figura 8.** Representación esquemática de la activación del factor Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2). Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1). Ubiquitina (Ub). Especie reactiva de oxígeno (ERO).

El otro factor de transcripción implicado en la producción de las ERO es el NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). La oxidación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, la cual se produce mediante la fosforilación de I $\kappa$ B (molécula a la que se encuentra unida NF- $\kappa$ B en su forma inactiva en el citoplasma), provocando la separación de ambos elementos y la translocación de NF- $\kappa$ B libre al núcleo. La llegada del NF- $\kappa$ B activado al núcleo induce la expresión de genes involucrados en respuestas inflamatorias, inmunes y de fase aguda (citoquinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$ , IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ )<sup>48</sup> (Figura 9).

También se ha asociado el NF- $\kappa$ B con un incremento en la proliferación de CMLV<sup>49</sup>. Incluso algunos autores apuntan al factor de transcripción NF- $\kappa$ B como la clave en la inflamación y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, ya que está involucrado en la progresión de la inflamación y en el daño cardíaco y vascular, como es el caso de la patogénesis de la remodelación e insuficiencia cardíaca; además, la activación prolongada de NF- $\kappa$ B en el remodelado cardíaco es citotóxica, ya que promueve la insuficiencia cardíaca al desencadenar una respuesta inflamatoria crónica. También se ha observado la activación de NF- $\kappa$ B en condiciones de isquemia aguda y reperfusión durante un evento de angina inestable<sup>48</sup>



**Figura 9.** Representación esquemática de la activación del factor NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) e I $\kappa$ B (molécula inhibidora de NF- $\kappa$ B). Ubiquitina (Ub). Fosforilación (P). Especie reactiva de oxígeno (ERO).

### **1.3.2. Sistemas de defensa antioxidante.**

El efecto de las ERO está compensado por la acción de los sistemas antioxidantes biológicos. Estos constituyen la primera línea de defensa; se encargan de eliminar las ERO, especialmente el  $O_2^{\cdot-}$  y el  $H_2O_2$ , para que a partir de éstos no se pueda generar  $OH^{\cdot}$  y  $OONO^{\cdot}$  que, como se ha visto anteriormente, son moléculas mucho más reactivas y nocivas para el organismo.

Los principales antioxidantes enzimáticos son la superóxido dismutasa (SOD), responsable de la regulación de los niveles de  $O_2^{\cdot-}$ , ya que cataliza la dismutación de este a  $H_2O_2$ ; la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx), enzimas encargadas de la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ . En el caso de la GPx, esta utiliza el glutatión reducido (GSH) como donador de electrones (Figura 5). Este GSH se oxida para generar glutatión oxidado (GSSG), el cual es nuevamente reducido a GSH mediante la glutatión reductasa (GR) <sup>33</sup>.

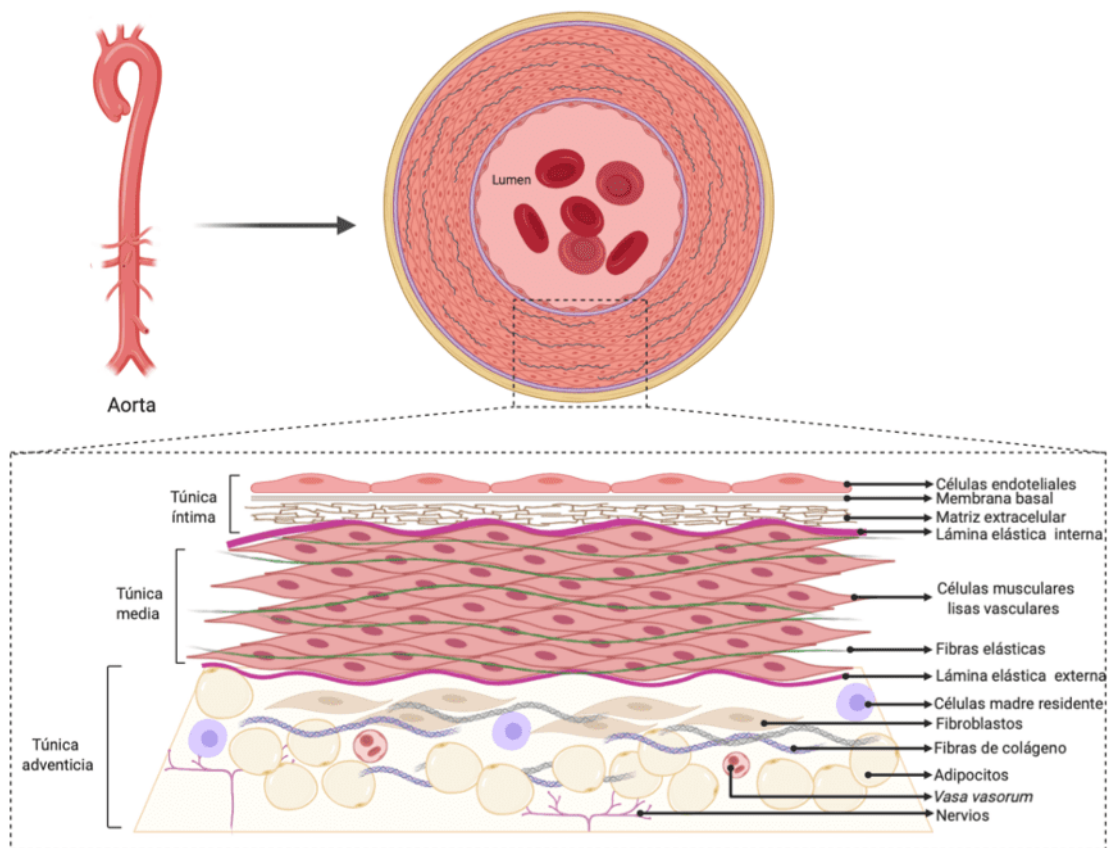
Los antioxidantes no enzimáticos se dividen en antioxidantes metabólicos y nutrientes antioxidantes. Los primeros son moléculas endógenas generadas por el metabolismo corporal (ácido lipoico, glutatión, L-arginina, L-carnitina, coenzima Q-10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metales, transferrina, etc.) <sup>50</sup>. Por otro lado, los nutrientes antioxidantes (exógenos) incluyen compuestos que deben ser proporcionados por medio de alimentos o suplementos. Entre ellos se encuentran la vitamina E, vitamina C, carotenoides, selenio, magnesio, zinc, flavonoides, ácidos grasos omega-3, omega-6 <sup>51</sup>. Cabe mencionar que los aminoácidos como la L-arginina o la L-carnitina, pueden actuar como antioxidantes endógenos y exógenos, ya que además de ser sintetizados por el organismo, también se pueden obtener a través de la dieta <sup>52</sup>.

### **1.4. Estructura de la pared vascular: morfología e histología de la arteria aorta.**

Las arterias se pueden subdividir en dos tipos en base a sus propiedades funcionales y morfológicas. Por un lado están las arterias elásticas ricas en elastina,

como la aorta y la carótida, que tienen importantes propiedades en la transmisión de la onda del pulso de presión que se origina en el ventrículo izquierdo; mientras que por otro lado están las arterias musculares, como las femorales o mesentéricas, las cuales tienen un mayor contenido de musculatura lisa y se encargan de distribuir la sangre según las necesidades del momento, en función de su grado de vasoconstricción <sup>53</sup>.

La estructura de la pared arterial comprende tres capas o túnicas: la íntima, la media y la adventicia, las cuales están delimitadas por la lámina elástica interna y externa (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática de un corte transversal de una arteria elástica (p.ej. aorta). Se muestran las diferentes capas que constituyen la pared arterial.

La túnica íntima está compuesta por CE vasculares aplanadas distribuidas en monocapa continua, formando una barrera semipermeable altamente regulada. Las CE vasculares están interconectadas por complejos de unión intercelular (uniones

estrechas, adherentes, o comunicantes) y descansan sobre la membrana basal (MB) y la matriz intersticial. El ensamblaje de la MB está formado por interacciones específicas entre los componentes de la matriz extracelular (MEC), como son las fibras elásticas, fibronectinas, lamininas, el colágeno tipo I, III y IV, las entactinas (nidógenos), proteoglicanos, glucoproteínas y diferentes receptores de integrinas y no integrinas. La matriz intersticial es un gel hidratado enriquecido en sales, fluidos, polisacáridos y colágenos fibrilares que llena el espacio intersticial entre las células, actuando como amortiguador de compresión contra el estrés ejercido en la MEC <sup>54</sup>.

Las arterias poseen una lámina elástica interna (LEI), situada debajo de la capa subendotelial, que puede identificarse como una capa fenestrada de fibras elásticas que separa la túnica íntima de la media, permitiendo la difusión entre ambas capas. Sin embargo, en el caso de las arterias elásticas esta LEI no se puede diferenciar, ya que se confunde con el resto de las fibras elásticas que componen la túnica media y que proporcionan resistencia y elasticidad a la pared vascular (Figura 10).

La túnica media consiste en múltiples capas concéntricas de CMLV, principal tipo celular de esta capa, y fibras de colágeno tipo I y III interpuestas entre las fibras elásticas. A grandes rasgos, las CMLV pueden presentar dos fenotipos: contráctil o sintético, siendo capaces de cambiar de un estado a otro. En condiciones fisiológicas, las CMLV presentan un fenotipo contráctil, caracterizado por una baja tasa de proliferación y síntesis, proporcionando capacidad contráctil a la vasculatura y regulando el tono vascular en respuesta a mediadores vasoactivos.

Sin embargo, cuando las CMLV presentan un fenotipo sintético, se incrementa la proliferación, migración y renovación de la MEC, de modo que estos componentes desempeñan un papel clave en el mantenimiento del fenotipo de CMLV. En la MEC de la túnica media, la elastina actúa como un potente regulador autocrino de la actividad vascular de CMLV, siendo crítica para la estabilización de la estructura arterial al inducir un estado contráctil quiescente. A continuación, delimitando la túnica media de la



adventicia, se encuentra la lámina elástica externa (LEE), consistente en una gruesa capa de fibras elásticas menos prominente que la LEI (Figura 10).

La túnica adventicia presenta un grosor variable a lo largo del circuito vascular, siendo relativamente más gruesa en las arterias musculares que en las arterias elásticas. El tipo celular predominante en esta capa son los fibroblastos, considerados como reguladores críticos de la función de la pared vascular en condiciones fisiológicas y patológicas. Los fibroblastos también regulan la síntesis y secreción de componentes principales de la MEC en la adventicia, como el colágeno tipo I y III que proporcionan integridad estructural a la vasculatura. En la adventicia también están presentes poblaciones de células madre residentes que contribuyen al crecimiento y reparación de la pared del vaso (Figura 10).

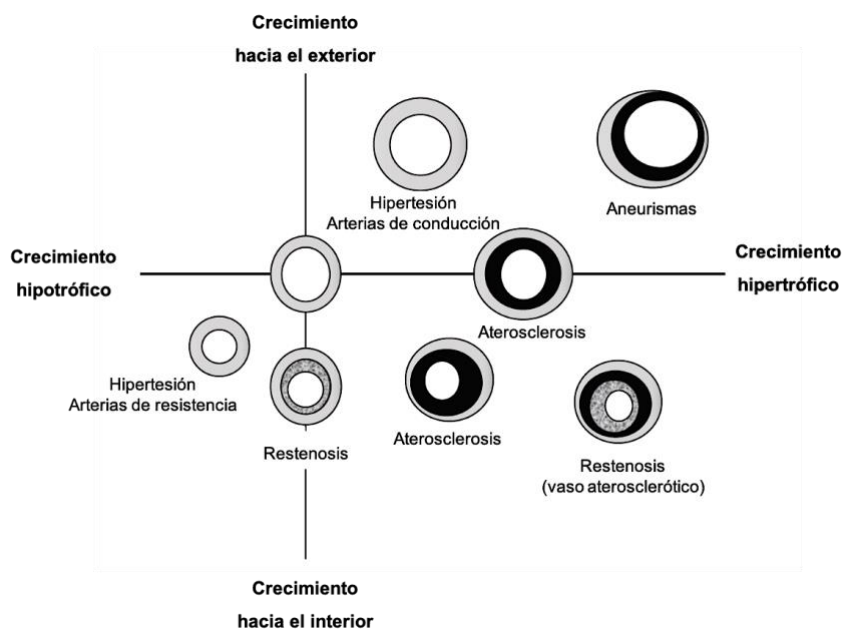
Recientemente, Witter y cols.<sup>55</sup> han propuesto otra visión diferente a la anteriormente mencionada sobre la túnica adventicia. Estos autores sugieren que la adventicia no es una única capa, sino que está compuesta de dos capas: una adyacente a la túnica media, que contiene tejido conectivo denso; y otra capa más externa, que contiene tejido conectivo laxo, pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*), nervios y adipocitos<sup>55</sup>.

#### **1.4.1. Remodelación vascular e hipertensión arterial.**

Las arterias poseen la capacidad de adaptar la estructura de la pared vascular y mantener el tamaño del lumen apropiado para permitir el flujo normal sanguíneo; este proceso se denomina remodelación (o remodelado) vascular. La remodelación vascular aparece tanto en condiciones fisiológicas (como el embarazo o el envejecimiento) como en condiciones patológicas (por ejemplo, en la hipertensión o en la aterosclerosis)<sup>35</sup>. En cualquier caso, el proceso de remodelado se induce por la interacción dinámica entre mediadores como los factores de crecimiento locales, citoquinas inflamatorias, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos. En condiciones patológicas, como es el caso de las enfermedades cardiovasculares, son múltiples los factores que se ven

involucrados en el desarrollo de la remodelación vascular. Entre ellos tenemos los niveles excesivos de ERO, la disfunción endotelial, la inflamación, la proliferación o la migración de CMLV <sup>43,56</sup>, y otros procesos celulares como la organización del citoesqueleto y la síntesis o degradación de la MEC, siendo todos ellos altamente sensibles a las alteraciones en el medio redox intracelular <sup>57</sup>. En este sentido, es importante recordar el papel que desempeñan las ERO derivadas de la NOX1, las cuales están implicadas en la migración, proliferación y desdiferenciación de las CMLV.

Se ha establecido la siguiente clasificación para los distintos tipos de remodelado vascular (Figura 11): el **hipertrófico**, caracterizado por un incremento del grosor de la túnica media, de la ratio media/lumen y del área de la sección transversal vascular (ASTV), asociado con el crecimiento celular y la deposición de material; el **eutrófico**, en el que se produce una reorganización del material existente, pero sin cambios en el ASTV; y el **hipotrófico**, que presenta disminución del ASTV, donde hay una reducción de la cantidad de material. Tanto en el remodelado hipertrófico como el hipotrófico se puede producir una reducción o aumento del diámetro del lumen, denominado remodelación hacia el interior o hacia el exterior, respectivamente <sup>58</sup>.



**Figura 11.** Representación esquemática de los tipos de remodelado vascular.

Modificado de Renna y cols. <sup>58</sup>

El envejecimiento o la HTA presentan por excelencia una remodelación vascular de tipo hipertrófica en arterias grandes, siendo el incremento en la ratio media/lumen en pacientes un valor pronóstico para detectar el posible desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como son la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca, ataques isquémicos cerebrales o la insuficiencia renal <sup>59</sup>. Curiosamente, en un estudio reciente llevado a cabo en 48 mujeres y 43 hombres, se vislumbra una posible diferencia en el envejecimiento de los vasos pequeños con respecto al sexo, donde el sexo femenino se asoció con valores de ratio media/lumen más altos con respecto al masculino <sup>60</sup>.

En el remodelado vascular intervienen procesos como la proliferación y la migración de CMLV. Más concretamente, en la HTA se producen cambios hacia el fenotipo sintético de estas células, contribuyendo a la hipertrofia y remodelación del vaso <sup>38,61</sup>. En este fenotipo disminuye la expresión de proteínas contráctiles y, en consecuencia, la capacidad de estas para contraerse. En conclusión, en el remodelado vascular que aparece en la HTA, las CMLV migran y proliferan, y aumenta la síntesis de proteínas de la MEC, acumulándose todo ello en la túnica íntima a través de una serie de mecanismos moleculares que, junto al estrés oxidativo, desempeñan un importante papel <sup>62-64</sup>. Por otro lado, se han postulado varias teorías sobre el control de la remodelación vascular. La teoría clásica propone que, mediante la detección de estrés por cizallamiento, las células endoteliales perciben la magnitud de esta fuerza y la comparan con un valor preexistente. En caso de que existiesen desviaciones, se activan los mecanismos de remodelación para alterar el diámetro del vaso y devolver el flujo a nivel inicial. Otros modelos para explicar el remodelado vascular se basan en la existencia de varios elementos mecano-sensitivos (con sensibilidades diferentes), de forma que el ratio entre los mecano-sensores determinaría la dirección del remodelado hacia dentro o hacia fuera <sup>65</sup>.

#### **1.4.2. Fibrosis e hipertensión arterial.**

La fibrosis es la formación en exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano. Los procesos fibróticos surgen como consecuencia de un proceso reparativo (cicatrización), a diferencia de la formación de tejido conectivo fibroso como constituyente intrínseco de un órgano o tejido. La fibrosis desempeña un papel importante en la progresión y desarrollo de enfermedades, ya que, si este proceso se dilata en el tiempo y se vuelve crónico, da lugar a un deterioro o insuficiencia de la función del órgano o tejido. Este proceso es de vital importancia en la progresión de muchas enfermedades que afectan a diversos órganos como el hígado, el riñón, el pulmón o el sistema cardiovascular <sup>66-68</sup>.

En el caso de las enfermedades cardiovasculares, la fibrosis es inicialmente una respuesta adaptativa de reparación. Sin embargo, al ser un proceso progresivo, finalmente conlleva al empeoramiento de la rigidez arterial, extendiéndose gradualmente hacia el espacio intersticial vecino. La fibrosis vascular implica la acumulación de proteínas de la MEC (colágeno y fibronectina) en la túnica media, contribuyendo a la remodelación estructural y a la formación de cicatrices, como sucede en el desarrollo de la aterosclerosis <sup>69</sup>. Varios elementos implicados en los eventos fibróticos, como son la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, la inflamación, el estrés oxidativo o factores genéticos, están relacionados con la lesión y rigidez vascular, asociados a un depósito excesivo de MEC arterial.

En relación con este último aspecto, las proteínas implicadas en la regulación de la MEC son las metaloproteinasas de la matriz, MMP; y sus inhibidores endógenos específicos, denominados inhibidores tisulares de MMP (TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinases*). En el caso de la vasculatura, las MMP median una gran variedad de procesos como la angiogénesis, el remodelado vascular, el crecimiento celular, la proliferación, la migración, la diferenciación, la invasión y vascularización de los tejidos. Por ello, los TIMP ejercen su papel con el fin de evitar la degradación excesiva de la

MEC y mantener el equilibrio y correcto funcionamiento de las MMP. En la HTA, concretamente, la activación vascular de MMP2 y 9 se asocia con la acumulación de colágeno, y la activación de MMP8 y 13 se asocia con la degradación del colágeno. La activación de MMP2 y 9 a través de la señalización de TGF- $\beta$ 1/Smad, también induce la activación de miofibroblastos y una mayor infiltración de monocitos/macrófagos, lo que provoca estrés oxidativo, inflamación y lesiones en la pared vascular. Las alteraciones en el equilibrio entre MMP y TIMP pueden contribuir al fenotipo profibrótico de CMLV en el envejecimiento y la hipertensión. También se ha demostrado que el estrés oxidativo puede contribuir al aumento de la actividad aórtica de MMP2 durante la remodelación hipertrófica en la hipertensión temprana <sup>70</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, la rigidez arterial es causada principalmente por fibrosis excesiva acompañada de un depósito y formación de redes tridimensionales de colágeno, esto último debido a la interacción de este con azúcares resultado de la glicación de proteínas. Al mismo tiempo, se ve reducida la elasticidad, debido a un incremento de la fragmentación/degeneración de las fibras de elastina y a la necrosis de la túnica media. Como consecuencia de todo ello, los cambios vasculares que se producen se caracterizan por una reducción de NO, mayor generación de ERO, activación de factores de transcripción, estimulación de vías de señalización proinflamatorias y profibróticas, recambio reducido de colágeno, calcificación, proliferación de CMLV y remodelación de la MEC, contribuyendo todos estos factores a un aumento y mantenimiento de la fibrosis <sup>71</sup>.

Harvey y cols. <sup>71</sup> apuntan a que la rigidez arterial precede al desarrollo de la hipertensión, ya que la fibrosis se asocia con cambios estructurales, mecánicos y funcionales en la vasculatura, como son una mayor rigidez arterial, una menor elasticidad, distensibilidad deteriorada, disfunción endotelial y un tono vascular aumentado. Cabe destacar que la rigidez arterial tiene una relación causal bidireccional con la presión arterial, ya que la presión arterial alta causa lesiones en la pared arterial (lo que promueve la rigidez), mientras que la rigidez arterial en sí es la causa principal

del aumento de la presión arterial sistólica. Sin embargo, en la comunidad científica sigue siendo tema de debate si es la fibrosis quien precede a la HTA o viceversa <sup>71</sup>.

#### **1.4.3. El papel del TGF- $\beta$ 1 en el desarrollo de la fibrosis e hipertensión arterial.**

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), presenta tres isoformas (TGF- $\beta$ 1-3). Actúa como una citoquina multifuncional reguladora de diferentes procesos, incluyendo la división, diferenciación, migración, adhesión, organización y muerte celular. Este factor promueve la producción de la MEC, la homeostasis tisular y la embriogénesis. Es por ello que la desregulación de la vía TGF- $\beta$  se asocia con muchas enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes, fibróticas y cardiovasculares <sup>72</sup>. El TGF- $\beta$  se sintetiza como una proteína inactiva o latente, en la que su activación depende de su escisión proteolítica, de la trombospondina-1 (Tsp-1), plasmina, los microambientes ácidos, o la integrina  $\beta$ 6 <sup>73</sup>. El TGF- $\beta$ 1 puede modular dos vías de señalización: la canónica, donde el TGF- $\beta$ 1 se une al receptor 2 de TGF- $\beta$  y a la tirosina quinasa ALK, desencadenando una cascada de señalización gracias a la fosforilación de las proteínas Smad-2 o Smad-3, que forman un dímero con Smad-4 y son translocadas al núcleo; y la vía no canónica, mediada por MAPK/ERK (ERK, quinasa regulada por señal extracelular), quinasas c-Jun N-terminal (JNK), la proteína quinasa I $\kappa$ B (IKK), la PI3K/AKT o las GTPasas de la familia Rho. Ambas vías regulan la expresión de genes relacionados con proteínas de la MEC <sup>74</sup>.

La isoforma más relevante en el sistema cardiovascular, TGF- $\beta$ 1, está presente en las CE, CMLV, fibroblastos y macrófagos de la adventicia. Esta isoforma actúa aumentando la síntesis de proteínas de la MEC, y ocasiona generalmente la degradación o deposición de esta, junto a aumento de rigidez o la pérdida de elasticidad, cambios en la fuerza hemodinámica, inflamación de la pared, la alteración del tono venoso, proliferación celular y respuesta inmune.

Cabe destacar el doble papel que desempeña este factor de crecimiento. Se cree que la respuesta provocada por TGF- $\beta$ 1 depende en gran medida del contexto y

del tejido. Se sabe que puede regular de manera positiva o negativa los sistemas involucrados en la proliferación celular, la apoptosis, la diferenciación y la migración. Por ejemplo, en las primeras etapas de reparación de un tejido, el TGF- $\beta$ 1 parece actuar como un orquestador de la respuesta fibroproliferativa, estimulando la quimiotaxis de células reparadoras. En etapas posteriores, por el contrario, este factor regularía negativamente la fibrosis, a través de su efecto anti-proliferativo y apoptótico en células fibróticas <sup>74</sup>.

En el contexto del envejecimiento, y durante el desarrollo de la HTA, se sabe que hay un incremento tanto de Ang II, del estrés mecánico, de la expresión de ET-1 y de las ERO. Todo ello, junto con un aumento de la activación de TGF- $\beta$ 1, resulta en el desarrollo de la fibrosis vascular. Específicamente, en la patogénesis de la HTA, la sobreproducción de la MEC se ha atribuido a los cambios hemodinámicos asociados con el estrés mecánico y a factores de crecimiento como el TGF- $\beta$ 1, el cual a su vez activa la NADPH oxidasa con la consiguiente sobreproducción de ERO <sup>71</sup>. En CMLV de la arteria pulmonar humana, el TGF- $\beta$ 1 regula el crecimiento celular mediante un mecanismo redox mediado por la inducción de NOX4 <sup>75</sup>.

## **1.5. Vesículas extracelulares. Implicación en el desarrollo de enfermedades.**

### **1.5.1. Clasificación, composición y biogénesis de vesículas extracelulares.**

Las células son capaces de formar vesículas o recipientes de membrana que, cuando son liberadas al espacio extracelular, actúan facilitando la comunicación célula-célula. Estas vesículas están compuestas por una bicapa lipídica cuyo interior está cargado de una gran variedad de moléculas de señalización, incluidos ácidos nucleicos, proteínas y lípidos procedentes de las células originales que las crearon. Las vesículas atienden a varias denominaciones: nanovesículas, microvesículas, micropartículas o vesículas extracelulares (VE). A partir de ahora nos referiremos a ellas como VE. En función de su origen intracelular, se pueden clasificar en tres grupos: los cuerpos apoptóticos, las microvesículas y los exosomas. Las VE se consideran biomarcadores

potenciales, ya que son fáciles de detectar, siendo más estables que otros biomarcadores solubles y accesibles de manera no invasiva en la mayoría de los fluidos biológicos (p.ej. suero u orina) <sup>76,77</sup>. No existe un consenso en la comunidad científica sobre el tamaño exacto de las vesículas extracelulares, y debido a esta discrepancias nos hemos ceñido a la información más actualizada ofrecida por Mallocci y cols.<sup>76</sup>, cuya clasificación se detalla a continuación:

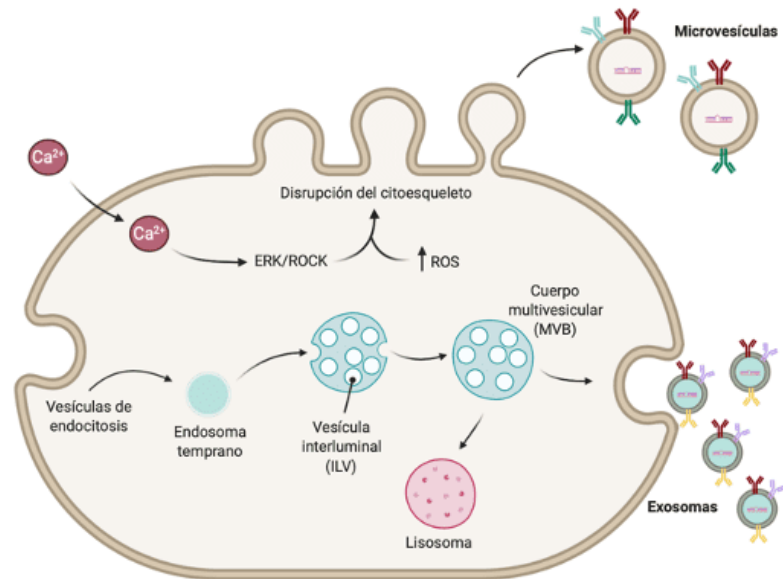
Los **cuerpos apoptóticos** presentan un tamaño de 50-5000 nm y son liberados exclusivamente por las células que sufren apoptosis. Llevan señales moleculares destinadas a atraer a los fagocitos a sitios apoptóticos para promover la eliminación de estas células. Los CA se subdividen en dos grupos según su carga: así, si portan un fragmento de un núcleo apoptótico (portadores de ADN), se les conoce como cuerpos apoptóticos nucleares; y si su carga es citoplasmática, se les conoce como cuerpos apoptóticos citoplasmáticos <sup>78</sup>.

Las **microvesículas** (MV) miden aproximadamente 100-1000 nm, y su liberación está precedida por la aparición de pequeñas protuberancias citoplasmáticas desprendidas por fisión. Este proceso aparece en diferentes tipos celulares: plaquetas, leucocitos, eritrocitos, células endoteliales y células tumorales, siendo las MV derivadas de plaquetas aproximadamente un 70-90% de las circulantes. La activación celular induce la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular, lo que lleva a la externalización de fosfatidilserina. Posteriormente, el aumento de  $Ca^{2+}$  se asocia con la activación de ERK/ROCK (ROCKO, quinasa asociada a Rho) y la interrupción del citoesqueleto, que da como resultado la formación de MV. Además, el proceso de liberación de las MV está vinculado a un aumento de ERO <sup>79</sup>.

Las MV presentan elementos de su origen de membrana celular, como ligandos y receptores, miARN y proteínas de mitocondrias, núcleos y compartimientos citosólicos. Pueden expresar proteínas compartidas por otros tipos de VE, como la actina, tubulina, endoplasmina, GAPDH y anexina II. Por ejemplo, las MV derivadas de neutrófilos y tumores están enriquecidas con MMP y otras enzimas proteolíticas, cuya función es la



digestión de la matriz extracelular, necesaria para el progreso de la inflamación y el crecimiento del cáncer<sup>80</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** Esquema ilustrativo sobre la formación de las microvesículas y exosomas.

Modificado de Mallocci y cols.<sup>76</sup>.

Los **exosomas**, de tamaño 30-150 nm, provienen del compartimento endosómico y se forman como vesículas interluminales (ILV, *interluminal vesicles*) por gemación interna de la membrana endosómica temprana, secuestrando proteínas, lípidos y citosol, para degradar, reciclar o exocitar este contenido. Los endosomas tempranos maduran en los endosomas tardíos, y la acumulación de multitud de ILV conduce a la formación de cuerpos multivesiculares (MVB, *multivesicular bodies*). El destino principal de los MVB es fusionarse con los lisosomas, asegurando la degradación de su contenido. Sin embargo, los MVB también pueden fusionarse con la membrana plasmática para liberar sus ILV como exosomas en el espacio extracelular<sup>81</sup> (Figura 9).

Al igual que las MV, los exosomas transportan múltiples proteínas y ácidos nucleicos, protegidos por una bicapa lipídica. Sin embargo, su composición es consecuencia de su formación a través del compartimento endosómico, así como de los diversos mecanismos asociados con su secreción. Por lo tanto, la composición de los

exosomas difiere de las MV y de las células de origen. Los exosomas parecen estar enriquecidos con proteínas de la MEC, de receptores de unión a heparina, de funciones de respuesta inmune y adhesión celular; mientras que las MV están enriquecidas en proteínas del retículo endoplásmico, proteosoma y mitocondrias. Los exosomas y las MV también difieren en el tipo de contenido de lípidos <sup>82</sup>.

### **1.5.2. Papel de las vesículas extracelulares en la hipertensión arterial.**

En los últimos años, varios estudios han resaltado el papel de las VE en las enfermedades cardiovasculares, y dentro de su contexto en el origen y desarrollo de la hipertensión arterial (HTA) <sup>83</sup>.

Los datos experimentales sugieren que la HTA va unida a un aumento en las concentraciones de VE circulantes <sup>84</sup>. Un estudio reciente llevado a cabo en ratas mostró por primera vez cómo los exosomas plasmáticos pueden modular la presión arterial sistémica, así como la estructura y función cardiovascular. En dicho estudio, los exosomas derivados de ratas con hipertensión espontánea (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) aumentaron significativamente la presión arterial sistólica en ratas control (WKY, Wistar-Kyoto); de manera recíproca, los exosomas procedentes de ratas control normotensas disminuyeron la presión arterial en las hipertensas. Además, los exosomas derivados de ratas hipertensas indujeron en ratas normotensas cambios estructurales moderados de la aorta torácica, como el engrosamiento de la pared, que reproducían los propios cambios observados en SHR. Por el contrario, los exosomas derivados de animales normotensos tendieron a revertir los cambios morfológicos observados en SHR <sup>85</sup>. Por otro lado, se ha observado que los exosomas circulantes liberados por células del endotelio vascular pulmonares y células madre mesenquimales juegan un papel importante en la modulación del remodelado vascular pulmonar. De modo que los exosomas representan objetivos prometedores que podrían usarse para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar <sup>86</sup>.

Las VE endoteliales son consideradas marcadores de la disfunción endotelial<sup>87</sup> y de daño vascular en curso. Por ejemplo, en el caso de patologías como la angina estable o el síndrome coronario agudo, las VE liberadas por el células endoteliales dañadas promueven el proceso de inflamación y trombosis, principalmente en el síndrome coronario agudo y en la enfermedad arterial coronaria estable<sup>88</sup>. Otro estudio reciente indica por primera vez un vínculo entre los patrones individuales de cambios hemodinámicos y mecánicos asociados con la HTA, con distintos patrones de VE endoteliales. La liberación de estas en la HTA es compleja; se ha visto que el incremento en la presión arterial sistólica está acompañado de un incremento en la liberación de VE, que se correlaciona a su vez con rigidez arterial y está inversamente relacionado con la función endotelial. Se cree que el flujo de la sangre en la HTA puede ejercer un daño mecánico sobre el endotelio que a su vez conduce al estado proinflamatorio del mismo, donde las VE pueden ser utilizadas como biomarcadores de proceso<sup>89</sup>.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **2.1. Hipótesis del estudio.**

El sunitinib no solo es uno de los fármacos más importantes para el tratamiento del carcinoma de células renales metastásico, de tumores neuroendocrinos pancreáticos y de tumores malignos no resecables y/o metastásicos del estroma gastrointestinal resistentes a imatinib; en la actualidad, su eficacia está siendo también evaluada frente a una amplia variedad de tumores sólidos -incluyendo cánceres de mama, de pulmón y colorrectales-, así como en otras patologías asociadas a procesos angiogénicos en una multitud de órganos. Sin embargo, y desgraciadamente, se presentan efectos adversos tras el tratamiento del sunitinib, como es el desarrollo de la hipertensión arterial. Por este motivo, el conocimiento de los mecanismos que subyacen en el desarrollo de la hipertensión arterial y del daño vascular asociado al tratamiento con este fármaco, resulta de gran trascendencia para impedir o paliar este efecto adverso; además de una gran relevancia desde un punto de vista clínico, ya que ayudaría a establecer nuevas estrategias terapéuticas que logren mitigarlo, ofreciendo a los pacientes una mayor calidad de vida durante el tratamiento con este inhibidor de tirosina quinasa.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la hipertensión arterial que se desarrolla después de iniciar un tratamiento con sunitinib es principalmente consecuencia de una disfunción endotelial causada por una activación excesiva de la enzima NADPH oxidasa, que conduce a la generación de estrés oxidativo con remodelación y fibrosis vascular.

## **2.2. Objetivos.**

### **2.2.1. Objetivo general.**

El objetivo general de la tesis es estudiar los mecanismos implicados en el desarrollo de la hipertensión arterial tras el tratamiento con sunitinib. Con esta memoria, pretendemos demostrar la existencia de daño vascular en la aorta tras el tratamiento durante tres semanas con sunitinib, debido a la disfunción endotelial inducida por el

fármaco a través de un aumento en la activación de la enzima NADPH oxidasa; esto condiciona el remodelado de la estructura vascular y la aparición de fibrosis, junto con una alteración en los mecanismos implicados en la regulación del estado oxidativo. Además, demostraremos el papel de las vesículas extracelulares circulantes en los mecanismos patogénicos subyacentes al tratamiento con sunitinib.

### **2.2.2. Objetivos específicos.**

- 1) Estudiar la función vascular en anillos aórticos de rata, analizando los posibles efectos dañinos del sunitinib sobre la contracción y relajación dependiente e independiente de endotelio, en presencia y ausencia de un inhibidor de la síntesis de NO (N ( $\omega$ )-nitro-L- arginina metil éster, L-NAME). Además, se estudiará el papel de las vesículas extracelulares (VE) circulantes obtenidas a partir de ratas tratadas con sunitinib sobre la función vascular.
- 2) Realizar un análisis estructural de la pared vascular de la aorta. Para conseguir este objetivo, se llevará a cabo un estudio morfométrico mediante microscopía óptica, determinando el área de sección transversal y el espesor de la túnica media en secciones de aorta teñidas con hematoxilina-eosina.
- 3) Analizar indicadores de procesos fibróticos, realizando la tinción del Tricrómico de Masson junto a técnicas de biología molecular para estudiar la localización y expresión de colágeno de tipo I (Col1) y la expresión génica y proteica de TGF- $\beta$ 1. También mediremos la expresión génica de MMP9 y TIMP1, principales proteínas implicadas en la regulación de la fibrosis.
- 4) Determinar el estado oxidativo vascular analizando: i) la producción de ERO (anión superóxido) mediante tinción con DHE; ii) la actividad y expresión génica y proteica de las isoformas del sistema NADPH oxidasa más abundantes en la vasculatura (NOX1, NOX2 y NOX4); y iii) la localización de NOX1 mediante inmunofluorescencia en las diferentes capas de la



aorta, debido a la implicación de esta isoforma en los procesos de disfunción endotelial, inflamación y migración de células musculares lisas vasculares.

- 5) Medir diferentes marcadores implicados en la defensa antioxidante y en la biodisponibilidad del NO. Entre ellos: i) la expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes (SOD, GR y GPx); ii) la expresión y activación de la eNOS mediante el estudio de su grado de fosforilación; iii) el grado de nitrosilación de las proteínas; y iv) la expresión génica de los factores de transcripción Nrf2 y NF- $\kappa$ B, implicados en el desarrollo del estrés oxidativo.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



**Lista de reactivos y anticuerpos.**

- 1-Butanol, PanReac AppliChem. Art. 141082
- 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP), Sigma-Aldrich. Art. T1642
- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), Thermo Fisher Scientific. Art. D1306
- Acetilcolina cloruro (ACh), Sigma-Aldrich. Art. A6625
- Ácido acético glacial, PanReac AppliChem. Art. 141008
- Ácido bórico, Merck. Art. 1.00165
- Ácido clorhídrico, PanReac AppliChem. Art. 141019
- Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1) 30%, PanReac AppliChem. Art. A3636
- Agarosa estándar baja EEO, Ecogen. Art. AG0120
- Agua-DEPC, Thermo Fisher Scientific. Art. AM9906
- Albúmina de suero bovino (BSA), Sigma-Aldrich. Art. A6793
- *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent*, Cytiva. Art. RPN2232
- Amonio persulfato (APS), Sigma-Aldrich. Art. A3678
- *Amplex red hydrogen/peroxidase assay kit*, Thermo Fisher Scientific. Art. A22188
- Anticuerpo anti-  $\beta$ -Actin, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-47778
- Anticuerpo anti-Actin,  $\alpha$ -SMA, Sigma-Aldrich. Art. C6198
- Anticuerpo anti-CD31, Epitomics-Abcam. Art. ab2836
- Anticuerpo anti-CD31, R&D Systems. Art. AF3628
- Anticuerpo anti-Collagen1 $\alpha$ 1, R&D Systems. Art. AF6220
- Anticuerpo anti-eNOS (pS<sup>1177</sup>), BD Transduction Laboratories. Art. 612392
- Anticuerpo anti-eNOS (Thr<sup>495</sup>), Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-376751
- Anticuerpo anti-eNOS, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-376751
- Anticuerpo anti-goat Alexa Fluor 647, Thermo Fisher Scientific. Art. A-32849

- Anticuerpo anti-GPx-1/2, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-133160
- Anticuerpo anti-GR, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-32886
- Anticuerpo anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-2031
- Anticuerpo anti-NOX1, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-25545
- Anticuerpo anti-NOX2, Epitomics-Abcam. Art. ab129068
- Anticuerpo anti-NOX4, Epitomics-Abcam. Art. ab133303
- Anticuerpo anti-NT, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-32757
- Anticuerpo anti-rabbit Alexa Fluor 546, Thermo Fisher Scientific. Art. A-11010
- Anticuerpo anti-rabbit Alexa Fluor 647, Thermo Fisher Scientific. Art. A-21245
- Anticuerpo anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-2357
- Anticuerpo anti-sheep Alexa Fluor 555, Thermo Fisher Scientific. Art. A-21436
- Anticuerpo anti-SOD-1, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-11407
- Anticuerpo anti-TGF- $\beta$ 1, Santa Cruz Biotechnology. Art. sc-130348
- *Aspergillus* nitrato reductasa, Roche. Art. 10981249001
- Azul de bromofenol, Sigma-Aldrich. Art. B8026
- Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ), Sigma-Aldrich. Art. S5761
- *Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad Laboratories. Art. 500-0006
- *Blotting-Grade Blocker*, Bio-Rad Laboratories. Art. 170-6404
- Cloroformo, Sigma-Aldrich. Art. C2432
- Cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ), Sigma-Aldrich. Art. C3881
- Cloruro potásico (KCl), PanReac AppliChem. Art. A2939
- Cloruro sódico (NaCl), PanReac AppliChem, España. Art. 131659
- D-Glucosa, PanReac AppliChem. Art. A3666
- *DAPI Fluoromount-G*<sup>®</sup>, SouthernBiotech. Art. 0100-20
- Deoxicolato sódico, Sigma-Aldrich. Art. D6750
- Dihidroetidio (DHE), MedChemExpress. Art. HYD0079
- Dodecilsulfato sódico (SDS), Sigma-Aldrich. Art. L-4509

- EDTA·Na<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich. Art. E1644
- Eosina, PanReac AppliChem. Art. 251299
- Etanol absoluto, Merck. Art. 1.00983.1000
- Fenilefrina hidrocloreuro, Sigma-Aldrich. Art. P6126
- Formaldehído, PanReac AppliChem. Art. 131328.1211
- Gammaglobulina bovina, Bio-Rad Laboratories. Art. 500-0005
- GKT136901 (inhibidor de NOX1 y NOX4), Sigma-Aldrich. Art. 5340320001
- Glicerol, Sigma-Aldrich. Art. G5516
- Glicina, Sigma-Aldrich. Art. G8898
- Glucosa-6-fosfato (G6P), Roche. Art. 127647
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH), Sigma-Aldrich. Art. G5516
- Hematoxilina de Gill n°3, Sigma-Aldrich. Art. GHS3
- Hidróxido sódico, PanReac AppliChem. Art. 141687
- *High-Capacity cDNA Archive kit*, Applied Biosystems. Art. 4322171
- Isopropanol, Sigma-Aldrich. Art. I9516
- *iTaq Universal SYBR® Green Supermix*. Bio-Rad Laboratories. Art. 1725121
- Kit Tricómico de Masson, Merk. Art. HT15-1KT
- Lucigenina, Sigma-Aldrich. Art. M8010
- Marcador de peso molecular (*Broad-Way Dual Prestained Protein Marker*), Intron Biotechnology. Art. 24084
- Membrana de nitrocelulosa 0,45 µm, Bio-Rad Laboratories. Art. 162-0115
- Metanol, PanReac AppliChem. Art. 131091
- *Mini Trans-Blot® Cell*, Bio-Rad Laboratories. Art. 170-3935
- *Mini-PROTEAN® III Cell*, Bio-Rad Laboratories. Art. 165-3301
- ML171 (inhibidor específico de NOX1), Sigma Aldrich. Art. 175226
- N (ω)-nitro-L- arginina metil éster (L-NAME), Sigma-Aldrich. Art. N5751
- N-acetilcisteína (NAC), Sigma-Aldrich. Art. A7250

- NADPH, Sigma Aldrich. Art. N6505
- *Neo-Clear*<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich. Art. 1098435000
- *Neo-Mount*<sup>®</sup>, Merk. Art. 1.09016.0500
- Nitroprusiato sódico (NPS), Sigma-Aldrich. Art. 717778
- Nonidet P-40 (NP40), Sigma-Aldrich. Art. NP40S
- Parafina, Paraplast Plus. Sigma-Aldrich. Art. P3683
- PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*), Thermo Fisher Scientific. Art. 14190-250
- PEG-SOD, Sigma Aldrich. Art. S9549
- *Ponceau S*, Sigma-Aldrich. Art. P3504
- Potasio dihidrogenofosfato anhidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), PanReac AppliChem. Art. 121512
- Reactivo de Griess, Merk Millipore. Art. 1.09023
- *Red-Safe nucleic acid staining solution*, Intron Biotechnology. Art. 21141
- Sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), PanReac AppliChem. Art. 212486
- Sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), Pfizer. C.N. 656865
- Tampón de muestra, *Laemmli 2x concentrate*, Sigma-Aldrich. Art. S3401.
- TEMED, Bio-Rad Laboratories. Art. 161-0800
- *Tissue-Tek*<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup>, Sakura Finetek. Art. 4583
- Tris-hidroximetil-aminometano (*TRIZMA*<sup>®</sup>, Tris), Sigma-Aldrich. Art. T1378
- *TRIZol*<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific. Art. 15596018
- *Tween*<sup>®</sup> 20, Sigma-Aldrich. Art. P1379
- VAS2870 (pan-inhibidor de las isoformas de NOX), Merk Millipore. Art.492000



**Preparación de reactivos y tampones.**

- *Solución de Krebs-Henseleit (pH 7,4)*

NaCl .....	118,5 mM
KCl .....	4,7 mM
NaHCO <sub>3</sub> .....	25 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	2,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,2 mM
MgSO <sub>4</sub> .....	1,2 mM
D-glucosa .....	11 mM
- *Tampón de lisis*

Tris-HCl (pH 7,4) .....	50 mM
NaCl .....	150 mM
NP-40 .....	1%
Deoxicolato sódico .....	0,5%
Dodecilsulfato sódico (SDS) .....	0,1%
- *Solución de Tris-Borato-EDTA (TBE 10X)*

Tris .....	44,5 mM
Ácido bórico .....	44,5 mM
EDTA·Na <sub>2</sub> /NaOH (pH 8) .....	1 mM
- *Tampón mixto (10X)*

Azul de bromofenol .....	3,6 mM
Tris/HCl (pH 8) .....	50 mM
Glicerol .....	6% (v/v)
- *Mezcla de reactivos (High-Capacity cDNA Archive kit)*

Tampón RT 10X .....	10 µL
Random primers 10X .....	10 µL
Miz desoxinucleótidos 25X .....	4 µL

MultiScribe™ RT (50 U/ $\mu$ L) .....	5 $\mu$ L
Agua-DEPC .....	hasta 50 $\mu$ L

- *Gel concentrador de poliacrilamida*

H <sub>2</sub> O bidestilada .....	5,5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% .....	1,3 mL
Tris 1 M (pH 6,8) .....	1 mL
SDS 10% .....	80 $\mu$ L
APS 10% .....	80 $\mu$ L
TEMED .....	10 $\mu$ L

- *Gel separador de poliacrilamida al 10%*

H <sub>2</sub> O bidestilada .....	4 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30% .....	3,3 mL
Tris 1,5 M (pH 8,8) .....	2,5 mL
SDS 10% .....	100 $\mu$ L
APS 10% .....	100 $\mu$ L
TEMED .....	10 $\mu$ L

- *Tampón de electroforesis 10X*

Tris .....	25 mM
Glicina .....	0,192 M
SDS .....	0,1 %

- *Tampón de transferencia:*

Tris .....	20 mM
Glicina .....	150 mM
Metanol .....	20% v/v

- *Ponceau S al 0,5%*

Colorante Ponceau S .....	0,5 g
Ácido acético glacial .....	1 mL

- Agua bidestilada ..... 99 mL
- *Tris buffer salino (TBS)*
    - Tris/HCl (pH 7,5)..... 10 mM
    - NaCl..... 100 mM
  - *Solución de lavado (Tris buffer salino con Tween<sup>®</sup> 20, TBST)*
    - Tris/HCl (pH 7,5)..... 10 mM
    - NaCl..... 100 mM
    - Tween<sup>®</sup> 20 .....0,1% v/v
  - *Solución de bloqueo (TBST-M)*
    - Blotting-Grade Blocker ..... 5% en TBS



### 3.1. Animales de experimentación y tratamiento.

Los estudios se han realizado en ratas macho de la cepa Wistar, procedentes del Servicio de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y con una edad y peso inicial aproximado de 11-12 semanas y 280-300 gramos, respectivamente. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (n = 30/grupo):

1. Grupo control de ratas no tratadas.
2. Grupo Sunitinib, que corresponde al grupo de ratas tratadas con este fármaco a dosis de 25 mg/Kg de peso corporal/día durante un periodo de 3 semanas.

Los animales de experimentación se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Farmacia en condiciones estandarizadas de temperatura y luminosidad ( $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 12 h luz/12 h oscuridad), con libre acceso al agua de bebida y alimentados con pienso estándar. En el caso de los animales tratados con Su, se realizó una mezcla con pienso triturado y agua de bebida donde se incluyó el fármaco. Esta mezcla se mueve bien hasta obtener una pasta densa y homogénea que se prepara en forma de pellets, los cuales se almacenan a  $4^{\circ}\text{C}$  y protegidos de la luz. Durante el tiempo del periodo experimental y de tratamiento con Su (3 semanas), se realizó un seguimiento semanal del peso corporal y de la cantidad de comida ingerida para poder ajustar el tratamiento a la dosis requerida. Todos los procedimientos realizados cumplen con la normativa vigente (internacional, nacional y autonómica) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos<sup>5</sup>.

---

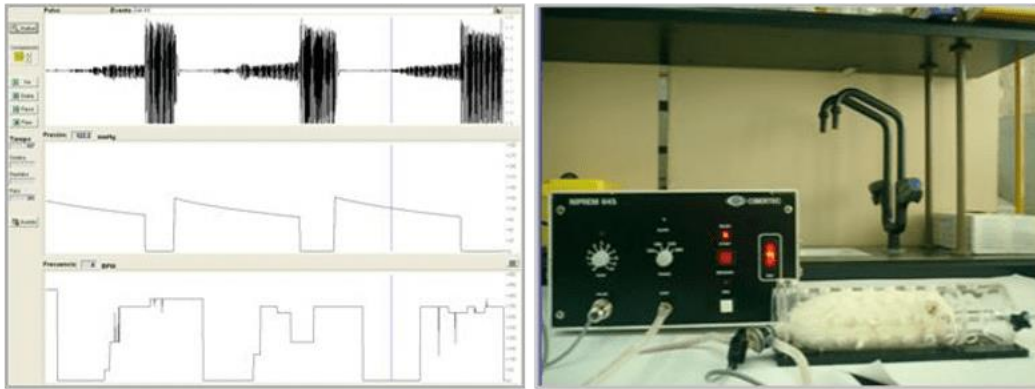
<sup>5</sup> Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 (DOUE núm. L 276 de 20 de octubre). Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (BOE núm. 34 de 8 de febrero), modificado por Real Decreto 1386/2018 de 19 de noviembre (BOE núm. 280 de 20 de noviembre). Decreto 80/2011 de 12 de abril (BOJA núm. 82 de 28 de abril).

### **3.2. Control de la presión arterial.**

Durante todo el periodo experimental se ha realizado un seguimiento semanal de las cifras de presión arterial sistólica y diastólica y de la frecuencia cardiaca de los animales. Esta medida se ha llevado a cabo mediante el método indirecto de oclusión de la cola. Para ello, se utiliza un medidor de presión NIPREM 645 versión 1.5. (CIBERTEC S.A., España) acoplado a un sistema de recogida de datos con soporte informático.

Una vez que se inmoviliza al animal en el interior de un cepo cilíndrico, se le coloca la cola debajo de una lámpara de infrarrojos durante 10-15 minutos, evitando someterlo a estímulos externos y controlando que la temperatura local no sea superior a 37°C; de este modo se consigue la vasodilatación necesaria para que los pulsos cardiacos sean lo más definidos posible. Transcurrido este tiempo, se desconecta la fuente de calor y se coloca el manguito presurizador y el transductor de pulsos cardiacos en la cola del animal (Figura 13). A continuación, se aumenta la presión del manguito colapsando la arteria caudal. En este momento, la señal del pulso queda 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. La despresurización continúa aumentando progresivamente la señal del pulso, de manera que la presión diastólica corresponde al momento en el que el pulso se hace de nuevo homogéneo y recobra prácticamente su valor inicial.

Los valores de presión arterial sistólica y diastólica de cada rata se han calculado a partir de la media aritmética de 3-4 mediciones sucesivas, realizadas siempre a la misma hora de la mañana y evitando en la medida de lo posible crear situaciones de estrés en el animal durante el proceso.



**Figura 13.** Instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea en los cuatro dos grupos experimentales de ratas. En la figura de la izquierda se aprecia la pantalla de análisis de registros; la imagen de la derecha ilustra el montaje para la adquisición de datos mediante el método indirecto de la oclusión de la cola, utilizando el registrador NIPREM 645.

### 3.3. Obtención de muestras de estudio y de las vesículas extracelulares.

Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se procede al sacrificio de los animales para la obtención de sangre y posterior extracción de la aorta (órgano objeto de nuestro estudio). Los animales, previo ayuno de 12-15 horas, se anestesian con 75 mg/kg ketamina + 10 mg/kg diazepam (vía intraperitoneal). A continuación, antes de proceder a la disección de la aorta, se recogen 4 mL de sangre en tubos con citrato tamponado 0.129 M como anticoagulante, mediante punción cardiaca directa con agujas de calibre 0,6 mm x 25 mm (23G). Inmediatamente, se centrifuga a 2500 g durante 15 minutos a 20°C para la obtención del plasma sanguíneo, y posterior centrifugación adicional a 2500 g durante 15 minutos a 20°C, para la obtención del plasma libre de plaquetas (PLP)<sup>90</sup> que contiene las vesículas extracelulares (VE) circulantes<sup>90</sup>. Este PLP se almacena a -80°C hasta el aislamiento definitivo de las VE. Para ello, se descongela el PLP y se centrifuga a 17000 g durante 30 minutos a 20°C, obteniéndose un pellet difícilmente apreciable a la vista. Se retira cuidadosamente el sobrenadante, dejando unos 100 µL en la base del tubo. A continuación, realizamos un lavado de ese pellet añadiendo lentamente 1 mL de PBS 1X, y centrifugando de nuevo a 17000 g durante 30 minutos a 20°C. Retiramos el exceso de PBS 1X, dejando de nuevo unos

100  $\mu$ L en la base del tubo. Posteriormente, usando una jeringa de insulina de 25 G, se resuspende el pellet en PBS 1X para disgregarlo. Finalmente, se determina la concentración de proteínas de las VE, que se usarán para los experimentos de función vascular en aorta.

Una vez extraída la sangre, se procede a la disección de la aorta. Una parte de la aorta obtenida se utiliza para los estudios de la función vascular, otra parte para el análisis de la expresión génica y proteica, y por último se reserva una parte para los estudios histológicos. Para el estudio de la función vascular, la aorta se utiliza inmediatamente. En el caso del análisis de la expresión génica y proteica, la aorta se lava con suero fisiológico frío (solución de NaCl al 0,9% p/v a 4°C) y se seca brevemente en papel de filtro. Posteriormente, se congela por inmersión en N<sub>2</sub> líquido conservándose a -80°C hasta su uso. Para los estudios histológicos, la aorta se somete a un proceso de inclusión en parafina (o en resina, en su caso) que se describe detalladamente en el apartado 3.8. de esta sección.

#### **3.4. Estudio de la función vascular.**

Para la realización de los experimentos de función vascular, la arteria se coloca en una placa de Petri con solución de Krebs-Henseleit a 4°C. Posteriormente, se procede a seccionar cuidadosamente la aorta con un bisturí para obtener 4 anillos de 2-3 mm de longitud cada uno. Cada anillo vascular se fija en sus extremos opuestos con dos alambres de plata y se monta en un baño de órganos (*Panlab Harvard Apparatus*; Figura 14) con solución de Krebs-Henseleit (10 mL/cámara) a 37°C y con burbujeo continuo de carbógeno (mezcla de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>).

**Figura 14.** Baño de órganos compacto de 4 cámaras (*Panlab Harvard Apparatus*), incluyendo el controlador termostático (izquierda).





Uno de los alambres se fija al baño de órganos, y el otro al transductor de fuerza isométrica (TRI201, *Panlab Harvard Apparatus*) conectado a un equipo de adquisición de datos (PowerLab® 8/30, ADInstruments) y este al ordenador con software LabChart 7 Pro versión 7.3.8 (ADInstruments). Inicialmente se aplica una tensión de 2 g a los anillos, y se procede a retensionar nuevamente a los 10 minutos y a los 20 minutos, para comenzar el experimento con una tensión basal igual en todos los anillos, dejando un periodo de estabilización de las muestras durante 90 minutos antes de iniciar los diversos experimentos propuestos. En primer lugar, se añade  $6 \times 10^{-2}$  M KCl a cada uno de los anillos. El KCl media la despolarización directa de la membrana celular gracias a la activación de los canales de calcio en la célula muscular, lo que nos permite observar rápidamente la viabilidad del tejido y obtener la fuerza máxima de contracción de cada anillo.

#### **3.4.1. Curva dosis-respuesta.**

Durante el tiempo de estabilización de los anillos vasculares se preparan las soluciones de cada fármaco a las concentraciones deseadas, mediante dilución seriada a partir de disoluciones madre. Con el objetivo de lograr las concentraciones deseadas en el contexto de cada experimento, los fármacos se añaden en concentraciones acumulativas crecientes para de esta manera poder estudiar la tensión isométrica generada por los mismos (curva dosis-respuesta). Para la realización de estos estudios se utilizaron agentes vasoconstrictores como la fenilefrina (Phe,  $10^{-9}$  -  $3 \times 10^{-5}$  M) y agentes vasodilatadores como la acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  -  $3 \times 10^{-5}$  M) y el nitroprusiato sódico (NPS,  $10^{-10}$  -  $3 \times 10^{-6}$  M). La respuesta vasodilatadora a ACh se midió también previa incubación de los anillos durante 30 minutos con vasomoduladores como el L-NAME ( $10^{-4}$  M; antagonista competitivo de la enzima eNOS y, por tanto, inhibidor de la síntesis de NO) y la N-acetilcisteína (NAC,  $10^{-6}$  M; neutralizador de ERO). Además, se realizaron estudios en anillos aórticos preincubados durante 90 minutos con vesículas

extracelulares (VE, 10 µg/mL) obtenidas de animales controles o de animales sometidos a tratamiento con Su.

La fenilefrina es un fármaco agonista del sistema nervioso simpático con acción predominante  $\alpha$ 1- adrenérgica. Sus efectos vasoconstrictores resultan de la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC) por la proteína Gq, lo que produce un aumento de inositol trifosfato (IP3) y de calcio. Además, se produce una estimulación de la proteína quinasa C (PKC) mediada por el diacilglicerol (DAG), produciéndose una fosforilación de la miosina que contribuye al aumento de la contracción muscular. La respuesta vasoconstrictora generada en presencia de la fenilefrina se expresa como el porcentaje de la contracción máxima inducida por  $6 \times 10^{-2}$  M KCl.

La acción vasodilatadora de la ACh requiere de la presencia del endotelio intacto, ya que induce la liberación de óxido nítrico (NO) por parte de las células endoteliales. A su vez, el NO difunde a la capa vecina de músculo liso, estimulando la enzima guanilato ciclasa con el consiguiente aumento de la síntesis de GMPc (que induce la relajación de la musculatura lisa vascular). Por su parte, el NPS induce una vasodilatación independiente de endotelio, ya que libera NO directamente sobre el músculo liso, con el consiguiente aumento en la concentración de GMPc.

### **3.5. Análisis en homogeneizados de aorta. Estudios de expresión génica y proteica.**

#### **3.5.1. Homogeneización de la aorta.**

La aorta se homogeniza en tampón de lisis en frío a 1500 rpm, utilizando un homogeneizador con micropistilo-teflon (Heidolph RZR 2102); se aplican 4 tandas de 15 segundos de homogeneización, con sendas pausas de 15 segundos en hielo entre cada tanda para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 2000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar restos de orgánulos, y el sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de

proteínas y para los estudios de expresión proteica mediante *Western blotting*, determinación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa y detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.5.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas en homogeneizados de aorta se determina siguiendo el método descrito por Bradford <sup>91</sup>, utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (que contiene ácido fosfórico y metanol) y un estándar de gammaglobulina bovina. Este método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo, dando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra <sup>91</sup>.

La técnica consiste en incubar, en una microplaca de ELISA, 5 µL de los homogeneizados (diluidos 1:10 con agua bidestilada), o de los estándares en su caso, con 250 µL del reactivo de Bio-Rad (previamente diluido 1:5 con agua bidestilada y filtrado a través de un papel Whatman® N°1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se leen las absorbancias en el lector de placas (Asys UVM340) a 595 nm. La coloración es estable en un plazo de 50 minutos.

Las soluciones estándares se preparan a partir de una solución madre de gammaglobulina bovina de concentración igual a 1,56 mg/mL. A partir de dicha solución madre se preparan seis soluciones patrón (P) cuyas concentraciones, expresadas en mg/mL, son: P1= 0,0975; P2= 0,195; P3= 0,39; P4= 0,78; P5= 1,56. Conociendo las concentraciones de los estándares y sus absorbancias, se elabora una curva patrón, la cual permite conocer las concentraciones de los homogeneizados de aorta a partir de sus absorbancias, teniéndose también en cuenta el factor de dilución de las muestras.

### 3.5.3. Determinación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa.

Se utiliza una técnica basada en un proceso de quimioluminiscencia, en el cual el anión superóxido (producto de la reacción catalizada por la enzima NADPH oxidasa)

oxida a moléculas de lucigenina, en una reacción que libera fotones de luz que son registrados en un luminómetro de tubo (BERTHOLD Junior LB 9509).

En un tubo de poliestireno para luminómetro se añaden, por duplicado, 10  $\mu\text{L}$  de muestra (convenientemente diluida con PBS 1X para que estos 10  $\mu\text{L}$  sean equivalentes a 5  $\mu\text{g}$  de proteínas totales); en el otro extremo del tubo, sin mezclarlo con la muestra, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de NADPH 3 mM (disuelto en PBS 1X). Por último, se añaden 280  $\mu\text{L}$  de lucigenina 5,3  $\mu\text{M}$  (disuelta en PBS 1X y protegida de la luz). La adición de este último reactivo permite la mezcla de todos los componentes y, por tanto, el inicio de la reacción (la cual se lleva a cabo a 37°C). En experimentos adicionales se realiza el mismo procedimiento, incluyendo incubaciones previas de la muestra durante 30 minutos con los inhibidores VAS2870 (10  $\mu\text{M}$ ; pan-inhibidor de las isoformas de NOX), GKT136901 (0,1  $\mu\text{M}$ ; inhibidor de NOX1 y NOX4) o ML171 (0,5  $\mu\text{M}$ ; inhibidor específico de NOX1). En todos los casos se recogen las lecturas de URL (unidades relativas de luz) en el luminómetro a los 6 minutos de iniciada la reacción.

#### **3.5.4. Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno.**

El kit utilizado, *Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*, utiliza el reactivo *Amplex<sup>®</sup> Red* (10-acetil-3,7-dihidroxyfenoxazina) para detectar peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el *Amplex<sup>®</sup> Red* reacciona con  $\text{H}_2\text{O}_2$  con una estequiometría 1:1, originando un producto rojo fluorescente, la resorufina. Esta tiene una excitación y emisión máximas a 571 nm y 585 nm, respectivamente, y posee un coeficiente de extinción alto ( $58000 \pm 5000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), por lo que se puede realizar el ensayo mediante fluorescencia o espectrofotometría.

En primer lugar, se prepara una curva estándar diluyendo la solución de trabajo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20 mM) en tampón de reacción 1X hasta obtener concentraciones desde 0 a 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A continuación, se hacen preparan diluciones 1/10 de las muestras (obtenidas según se describe en el apartado 3.5.2. de esta sección) en tampón de

reacción 1X, y se cargan 50  $\mu\text{L}$  de las muestras o estándares (por triplicado en ambos casos) en pocillos de una placa ELISA.

Por otro lado, se mezclan 50  $\mu\text{L}$  de *Amplex<sup>®</sup> Red* 10 mM (diluido extemporáneamente en DMSO), 100  $\mu\text{L}$  de *horseradish peroxidase* (HRP) 10 U/mL y 4,85 mL de tampón de reacción 1X, para obtener la solución de trabajo de 100  $\mu\text{M}$  de *Amplex<sup>®</sup> Red*, y 0,2 U/mL de HRP. Se añaden 50  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo a las muestras o estándares, y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación, se procede a medir la absorbancia a 560 nm, expresándose los resultados obtenidos ( $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) como porcentaje relativo respecto del grupo Control.

### 3.5.5. Determinación de la producción de óxido nítrico.

Uno de los métodos utilizados para estimar la formación de NO es la cuantificación del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que es uno de los dos productos primarios, estables y no volátiles del NO. Este ensayo está basado en el método descrito por Griess<sup>92</sup>, y consiste en una reacción química que usa sulfanilamida y N-1-naftiletilenodiamida dihidrocloro (NEDDC) bajo condiciones acídicas (en presencia de ácido fosfórico). Este sistema detecta  $\text{NO}_2^-$  en una enorme variedad de fluidos y tejidos biológicos.

Previamente al ensayo, los tejidos se someten a una incubación con nitrato reductasa, para conseguir que los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) se transformen en nitritos y de esa forma determinar el contenido de NO como la suma de nitritos y nitratos ( $\text{NO}_x$ ).

Los reactivos se añaden en microtubos eppendorf de 1,5 mL en el siguiente orden: 7  $\mu\text{L}$  de tampón Tris/HCl 1 M (pH=7,5), 10  $\mu\text{L}$  de NADPH 0,02 mM, 23  $\mu\text{L}$  de la mezcla glucosa-6-fosfato(G6P)/glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa(G6PDH) (2200  $\mu\text{L}$  de G6P 5 mM y 330  $\mu\text{L}$  de G6PDH 10 U/mL) y 10  $\mu\text{L}$  de *Aspergillus* nitrato reductasa (1 U/mL). Sobre estos tubos se añaden 50  $\mu\text{L}$  de muestra, blanco (agua bidestilada) o patrón (se elaboran distintas diluciones a partir de la solución patrón de 320  $\mu\text{M}$ : 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320  $\mu\text{M}$ ). Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se depositan 75  $\mu\text{L}$  de la correspondiente mezcla reactiva

sobre una microplaca de 96 pocillos. Se añaden, además, 75  $\mu\text{L}$  de reactivo de Griess sobre cada pocillo, se mezcla de nuevo y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lee la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas. En experimentos en paralelo, las muestras se incuban durante 30 minutos, de manera previa a la adición del reactivo de Griess, con los inhibidores VAS2870, GKT136901 o ML171, a las concentraciones indicadas en el apartado 3.5.3 de esta sección. Los resultados se expresan finalmente en porcentaje con respecto a los valores del grupo Control.

### **3.6. Estudios de expresión génica.**

#### **3.6.1. Extracción de ARN total.**

El procedimiento para llevar a cabo este experimento es el siguiente: para evitar la contaminación y/o la degradación del ARN por acción de las enzimas ARNasas, la zona de trabajo y todo el material que se vaya a emplear se rocía previamente con etanol absoluto. En tubos cónicos de 2 mL de capacidad, se pesan entre 80-100 mg de muestra (aorta) y se añade 1 mL de la solución comercial *TRIzol*<sup>®</sup> (solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina). Seguidamente, se somete a la acción de un homogeneizador (Heidolph DIAX 900) en posición de velocidad máxima durante 15 segundos, y se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 200  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se agita vigorosamente mediante el vórtex, y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, para la separación de las distintas fases. Se recupera la fase superior acuosa, que contiene el ARN, y se deposita en el interior de tubos cónicos de 1,5 mL de capacidad. A continuación, se añaden 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, se mezcla (invirtiendo varias veces los tubos) y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga de nuevo a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, para obtener el precipitado de ARN. Posteriormente, se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, y se lava el precipitado con 1 mL de etanol al

75%, agitando en vórtex durante 20 segundos. El precipitado de ARN se recupera centrifugando a 8000 g durante 5 minutos a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, y para conseguir el secado completo del precipitado, se tapan los microtubos con *Parafilm*<sup>®</sup>, se hacen varias perforaciones pequeñas y se deja 15-20 minutos a temperatura ambiente (no se debe utilizar para el secado centrifugación y vacío, y tampoco se debe dejar secar completamente, ya que esto dificultaría la posterior resuspensión del precipitado). Una vez seco el precipitado, se añaden 50 µL de agua-DEPC, se deja 10 minutos a temperatura ambiente, y finalmente se resuspende haciendo pasar el volumen final a través de una punta de pipeta (con filtro) de 100 µL de capacidad.

Para medir la concentración de ARN obtenido, se toma 1 µL de muestra y se mide en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Los ácidos nucleicos absorben luz de manera predominante a 260 nm (A<sub>260</sub>), por lo que midiendo a esta longitud de onda obtenemos la concentración del ARN (1 unidad de absorbancia = 40 µg de ARN/mL). También se calcula la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, para conocer el grado de pureza del ARN (se debe obtener un valor entre 1,5 y 2 para considerar el ARN como "puro"). Por último, hay que comprobar la integridad del ARN para asegurarnos de que no ha sufrido degradación durante su extracción. Para ello, se realiza una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2%. En un microtubo eppendorf de 500 µL se mezcla 1 µL del tampón mixto con un volumen de ARN equivalente a 1 µg y agua-DEPC hasta completar un volumen de 10 µL. La mezcla se homogeneiza y se carga en uno de los pocillos del gel de agarosa. La electroforesis se realiza en una cubeta con solución TBE 1X, a un voltaje constante de 190 V durante 15-20 minutos. Transcurrida la electroforesis, el gel se coloca en un transiluminador bajo luz ultravioleta, debiéndose en observarse dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos, 18S y 28S. Esto confirmaría que el ARN no está degradado.

### **3.6.2. Retrotranscripción.**

El proceso de retrotranscripción consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN gracias a la reacción catalizada por la retrotranscriptasa. Para ello, hemos utilizado un kit suministrado por *Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Archive kit)*.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se comienza preparando en microtubos eppendorf un volumen equivalente a 2 µg de ARN total y agua-DEPC en cantidad suficiente hasta alcanzar los 10 µL. A continuación, se desnaturaliza el ARN calentando durante 10 minutos a 65°C, utilizando un termociclador (*Biometra® T Gradient*). Transcurrido este tiempo, se colocan los tubos inmediatamente a 4°C para evitar la renaturalización del ARN. Se aprovecha este tiempo para preparar la mezcla de reactivos comunes, según se indica al principio de esta sección en el apartado *Preparación de reactivos y tampones*. Finalmente, a los 10 µL de cada tubo de ARN se añaden 10 µL de dicha mezcla. Los 20 µL resultantes se llevan al termociclador (previamente programado para operar 10 minutos a 25°C, seguido de 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C).

### **3.6.3. PCR a tiempo real (RT-PCR).**

La principal característica de la PCR a tiempo real es que el análisis de los productos se realiza durante el proceso de amplificación, mediante la cuantificación de fluorescencia. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar fluorescencia simultáneamente. En este trabajo se ha utilizado el termociclador a tiempo real CFX96 versión 2.0. (Bio-Rad), que contiene un bloque de 96 pocillos con un fluorímetro acoplado. La señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado, puede generarse con compuestos fluorescentes que pueden ser específicos de ADNc, como el *SYBR® Green I*, o bien sondas fluorescentes específicas de secuencia, como las sondas *Taqman®*. En este caso, se ha utilizado como compuesto fluorescente el SYBR Green I, que es el más utilizado para la RT-PCR.



Para la realización de la RT-PCR, la mezcla de reacción se realiza añadiendo 10  $\mu\text{L}$  de *iTaq Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (2X)*, 0,6  $\mu\text{L}$  de cada uno de los cebadores específicos (sentido y antisentido) y 7,8  $\mu\text{L}$  agua bidestilada autoclavada. En la Tabla 1 se muestran los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias específicas de ADNc, en función del gen analizado. El gen correspondiente a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utiliza como gen constitutivo (*housekeeping*) para normalizar los resultados.

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
<b>Col1</b>	TCAGGGGCGAAGGCAACAGT	TTGGGATGGAGGGAGTTTACACGA
<b>MMP9</b>	TCGAAGGCGACCTCAAGTG	TTCGGTGTAGCTTTGGATCCA
<b>TIMP1</b>	CGCAGCGAGGAGGTTTCTCAT	GGCAGTGATGTGCAAATTTCC
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	GCCCTGGATACCAACTACTGCT	AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG
<b>NOX1</b>	TTCACCAATTCCCAGGATTGAAGTG GATGGTC	GACCTGTCACGATGTCAGTGGCCTT GTCAA
<b>NOX2</b>	CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT	CAATCCCAGCTCCCCTAACATCA
<b>NOX4</b>	TTGCTTTTGTATCTTC	CTTACCTTCGTCACAG
<b>eNOS</b>	GGGCCAGGGTGATGAGCTCTG	CCCTCCTGGCTTCCAGTGTCC
<b>SOD</b>	CGTCATTCACTTCGAGCAGAAGG	GTCTGAGACTCAGACCACATA
<b>GR</b>	GGAAACTCGCCCATAGACTT	CCAACCACCTTCTCCTCTTT
<b>GPx</b>	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA	CCGCAGGAAGGTAAGAG
<b>NF-kB</b>	CCTAGCTTTCTCTGAACTGCAAA	GGGTCAGAGGCCAATAGAGA
<b>Nrf2</b>	GCCAGCTGAACTCCTTAGAC	GATTCGTGCACAGCAGCA
<b>GAPDH</b>	GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG

**Tabla 1.** Secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados.

Previamente a la realización de las correspondientes RT-PCR de los genes de interés, se realiza un experimento de eficiencia para optimizar la cantidad de ADNc necesaria para garantizar la amplificación máxima de cada fragmento, siendo la misma de 1  $\mu\text{L}$  de ADNc diluido 1:10 en agua bidestilada autoclavada. Así, al cargar la reacción para la RT-PCR, se añade 1  $\mu\text{L}$  de ADNc diluido 1:10 en agua bidestilada autoclavada al utilizar los diferentes cebadores recogidos en la Tabla 1.

Una vez preparada la mezcla de reacción, se introduce la placa de 96 pocillos en el termociclador, programado de la siguiente manera: un ciclo inicial de 3 minutos a 95°C para la activación del *iTaq Universal SYBR<sup>®</sup> Green Supermix* y la desnaturalización

inicial del ADN, más 40 ciclos consistentes en una fase de desnaturalización (15 segundos a 95°C) y una segunda y última fase de hibridación y elongación (1 minuto a 60°C).

Una vez realizado el experimento, el análisis de los resultados se realiza con el programa *CFX Maestro Software* versión 2.0. (Bio-Rad). El programa recoge los resultados y los representa gráficamente como curvas de amplificación en las que se relaciona la intensidad de la señal fluorescente con el tiempo, expresado como número de ciclos de la amplificación. Para el análisis cuantitativo de los productos de la PCR, se ha empleado un método de cuantificación relativo, expresando el marcador en función de un gen constitutivo, que es un gen expresado en un nivel idéntico en todas las muestras analizadas. Como se ha indicado, el gen empleado a tal efecto ha sido el correspondiente a la enzima GADPH. La cuantificación se realiza mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Ct se define como el ciclo en el cual la curva de amplificación se distingue del ruido de fondo y es dependiente de la cantidad inicial de ADNc.

### **3.7. Estudios de expresión proteica.**

#### **3.7.1. Fundamento del Western blotting.**

Para la cuantificación relativa de proteínas se ha utilizado la técnica de *Western blotting* (transferencia electroforética de proteínas), que permite la separación de proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE); a continuación, todas las proteínas presentes en la muestra son transferidas e inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas objeto de estudio son: TGF- $\beta$ 1, 50 kDa; NOX1, 22 kDa; NOX2, 60 kDa; NOX4, 70 kDa; SOD-1, 23 kDa; GR, 65 kDa; GPx-1/2, monómero 23 kDa; residuos de 3-nitrotirosina (NT); eNOS (total, pS<sup>1177</sup> y Thr<sup>495</sup>; 140 kDa) y  $\beta$ -actina, 48 kDa, utilizándose esta última como control de carga en cada una de las membranas analizadas, ya que es una proteína que se expresa de forma constitutiva.

Las proteínas se identifican gracias al empleo de anticuerpos específicos (Tabla 2). Para la realización de este experimento se ha utilizado un equipo de Bio-Rad Laboratories, que incluye los componentes *Mini-PROTEAN® III Cell* y *Mini Trans-Blot® Cell*.

A1	Dilución A1	A2	Dilución A2
<b><i>Rabbit polyclonal anti-TGF-β1</i></b>	1:3000	<i>Mouse anti-rabbit</i>	1:5000
<b><i>Rabbit polyclonal anti-NOX1</i></b>	1:1000	<i>Mouse anti-rabbit</i>	1:2000
<b><i>Rabbit monoclonal anti-NOX2</i></b>	1:8000	<i>Mouse anti-rabbit</i>	1:12000
<b><i>Rabbit monoclonal anti-NOX4</i></b>	1:7500	<i>Mouse anti-rabbit</i>	1:14000
<b><i>Mouse monoclonal anti-SOD-1</i></b>	1:1000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:2000
<b><i>Rabbit polyclonal anti-GR</i></b>	1:5000	<i>Mouse anti-rabbit</i>	1:10000
<b><i>Mouse monoclonal anti-GPx-1/2</i></b>	1:2000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:4000
<b><i>Mouse monoclonal anti-3-Nitrotyrosine</i></b>	1:1000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:2000
<b><i>Mouse monoclonal anti-eNOS total</i></b>	1:2000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:4000
<b><i>Mouse monoclonal anti-eNOS (Ser<sup>1177</sup>)</i></b>	1:2000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:4000
<b><i>Mouse monoclonal anti-eNOS (Thr<sup>495</sup>)</i></b>	1:2000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:4000
<b><i>Mouse monoclonal anti-β-Actin</i></b>	1:20000	<i>Goat anti-mouse</i>	1:30000

**Tabla 2.** Condiciones para la inmunodetección de cada anticuerpo. A1: anticuerpo primario. A2: anticuerpo secundario. En esta tabla observamos las condiciones de inmunodetección para las proteínas TGF-β1, NOX1, NOX2, NOX4, SOD-1, GR, GPx-1/2, residuos de 3-nitrotirosina (NT), eNOS (total, pS<sup>1177</sup> y Thr<sup>495</sup>), y β-actina.

### 3.7.2. Preparación de las muestras.

La aorta se homogeneiza como se describe en el apartado 3.5.1. de esta sección. A continuación, se mezclan volúmenes iguales de homogeneizados de aorta (equivalentes a 80 µg de proteínas para la determinación de eNOS (total, pS<sup>1177</sup> y Thr<sup>495</sup>), NOX1, NOX2 y NT; 40 µg de proteína en el caso de la TGF-β1 y GPx-1/2; y 30 µg de proteína en el caso de SOD-1, GR, NOX4 y de tampón de muestra 2X. La proteína β-actina se utiliza como control de carga en los distintos pocillos del gel. Esta mezcla de

homogeneizado y tampón se calienta durante 5 minutos a 95°C para posibilitar la desnaturalización de las proteínas presentes en el homogeneizado de aorta. Pasado este tiempo, las muestras se colocan inmediatamente en hielo para su conservación hasta que se realice la electroforesis.

### **3.7.3. Electroforesis.**

Dado que las proteínas tienen carga neta a un valor de pH diferente de su punto isoeléctrico, pueden migrar en un campo eléctrico, de modo que su velocidad de migración será dependiente de su densidad de carga (relación entre la carga y la masa de esa proteína). Al estar cargadas negativamente, las proteínas viajan hacia el cátodo (polo positivo) durante la electroforesis.

La electroforesis de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida, cuyo grado de polimerización permite obtener diferentes tamaños de poro por el cual migran las proteínas, lo que permite la caracterización de las proteínas en estudio. Estos geles constan de un gel concentrador (que concentra todas las proteínas en un determinado lugar) y un gel separador (cuya función es la de separar las proteínas según su peso molecular); en nuestro caso hemos utilizado geles al 10%.

Se coloca el gel en una cubeta de electroforesis y se cargan las muestras en los pocillos, añadiendo además en uno de ellos un marcador de peso molecular (el cual permitirá identificar los distintos pesos moleculares de las correspondientes proteínas al final del proceso). Finalmente, se llena la cubeta *Mini-PROTEAN® III Cell* con tampón de electroforesis, se cierra el circuito, y se aplica un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 1 hora, vigilando que el frente de muestra (identificable gracias al azul de bromofenol presente en el tampón de muestra) no alcance el extremo inferior del gel separador.

#### 3.7.4. Transferencia.

Debido a la extrema fragilidad del gel de poliacrilamida en el que se han separado las distintas proteínas, estas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, mediante un sistema de electrotransferencia (*Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell*, Bio-Rad). Una vez terminada la electroforesis, se separa y elimina el gel concentrador, para quedarnos únicamente con el gel separador (que es el que posee todo el bandeo de proteínas separadas por su peso molecular) y proceder al montaje del casete para realizar la transferencia. Para ello, en una bandeja con tampón de transferencia se prepara un sándwich en el interior del casete con los siguientes elementos: una esponja, un papel de filtro Whatman<sup>®</sup> 3MM (de la misma medida que el gel separador), el gel separador, la membrana de nitrocelulosa (también de la misma medida que el gel separador), otro papel de filtro y otra esponja. Se cierra bien el casete y se coloca dentro de la cubeta de transferencia junto con un bloque de hielo (suministrado con el sistema) y un agitador magnético. Se llena la cubeta de tampón de transferencia y se cierra el circuito para realizar la transferencia, aplicando un voltaje constante de 100 V durante una hora. La transferencia debe realizarse en cámara fría.

Una vez terminada la transferencia, se debe de comprobar que esta se ha realizado adecuadamente. Para ello, se desmonta el sándwich y se coloca la membrana en un recipiente con colorante *Ponceau S* durante unos segundos. Eliminando el exceso de colorante con sucesivos lavados con agua, se debe distinguir en cada carril el patrón de bandas correspondientes a las diferentes proteínas que componen las muestras.

#### 3.7.5. Inmunodetección.

Se basa en la detección de cada una de las proteínas que buscamos en la membrana de nitrocelulosa, mediante el empleo de anticuerpos específicos. Se incuba la membrana de nitrocelulosa en 25-30 mL de solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Transcurrido este tiempo, se incuba la membrana con el anticuerpo

primario específico, dejándolo toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación, se hacen 8 lavados de 3 minutos cada uno, para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado a la membrana. Posteriormente, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (durante 1 hora a temperatura ambiente), y se vuelven a realizar 8 lavados de 3 minutos cada uno. Por último, se procede al revelado de la membrana; este paso permite visualizar las proteínas mediante quimioluminiscencia, utilizando el reactivo *ECL™ Select Western Blotting Detection Reagent* y un equipo para la adquisición de imágenes por quimioluminiscencia (Amersham™ Imager 600). Las bandas de interés se han analizado mediante densitometría óptica, utilizando ImageJ versión 2.0.0-rc-69 / 1.52p.

### **3.8. Estudios histológicos.**

Las técnicas histológicas y la microscopía nos ayudan a comprender la estructura en detalle tanto del tejido como de las células que lo comprenden. Además, nos permiten correlacionar la estructura de un tejido con su función orgánica. Este tipo de análisis son esenciales a nivel clínico para el diagnóstico de enfermedades.

#### **3.8.1. Procesado de los tejidos.**

Cuando tenemos intención de utilizar un tejido para realizar estudios de microscopía, es importante que mantengamos, en la medida de lo posible, la estructura original de dicho tejido desde el momento de la obtención del órgano. Con este fin, la pieza a estudiar se somete a una serie de procesos que se describen en detalle en este apartado.

#### **3.8.2. Fijación.**

El primer paso del proceso consiste en la preservación de la muestra mediante la fijación del tejido, con objeto de mantener los detalles estructurales microscópicos de tejidos y células. Para tal fin, el tejido (aorta) es sumergido en formaldehído al 4% en PBS durante 24 horas en una noria rotativa de agitación (GP70, Selecta). Transcurrido este tiempo, se introduce la aorta dentro de un casete durante el resto del procesado.

### 3.8.3. Deshidratación.

El siguiente paso es la deshidratación del tejido, proceso en el que vamos a sustituir el agua de este por parafina. Para ello, sumergimos los casetes secuencialmente en cubetas tipo Coplin que contienen diluciones de etanol en concentraciones crecientes. En primer lugar, el órgano se sumerge en etanol al 70% durante 12 horas, y tras esto se sumerge secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de etanol, 80%, 85%, 90%, 95% y 100%, durante 1 hora cada uno.

### 3.8.4. Inclusión en parafina y formación de bloques.

Una vez que el tejido está deshidratado, se procede a la inclusión de parafina de forma gradual. Previamente, se trata con etanol:*Neo-Clear*<sup>®</sup> (1:1) durante 2 horas y, a continuación, con *Neo-Clear*<sup>®</sup> puro durante 3 horas. El *Neo-Clear*<sup>®</sup> es una mezcla de hidrocarburos alifáticos que puede sustituir al xileno (disolvente orgánico) y que permite que la parafina caliente difunda hacia el interior de los tejidos de forma homogénea. A continuación, se sumerge el órgano en una mezcla de *Neo-Clear*<sup>®</sup>: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 casetes y utilizando un molde metálico. Los bloques se enfrían a 4°C durante 1-2 horas para solidificar la parafina, y, tras desmontarlos de los casetes, se mantienen a temperatura ambiente hasta el día de su corte.

### 3.8.5. Inclusión en resina y formación de bloques

Otro método empleado para incluir el tejido y formar un bloque, sin necesidad de los procesos de fijación, deshidratación e inclusión en parafina, es el uso de una resina hidrosoluble rica en glicoles, como es el caso de la marca comercial *Tissue-Tek*<sup>®</sup> O.C.T.<sup>™</sup>. En el molde con la resina, se incluye el tejido (aorta) y, de manera paulatina, este se sumerge en nitrógeno líquido. La resina, que en un principio es viscosa, empieza

a tornarse opaca, lo que indica que se ha solidificado. Este proceso debe realizarse lentamente, para evitar que la muestra se resquebraje. El bloque formado puede almacenarse a -20°C hasta el momento de realizar los cortes, los cuales se destinarán para técnicas como la inmunofluorescencia y tinción de dihidroetidio.

### **3.8.6. Obtención de cortes de tejido.**

En el caso de los bloques de parafina, una vez desmontados ya están listos para obtener secciones o cortes de tejido con el micrótopo (MR-2258, Histo-line Laboratories). Las tiras de secciones obtenidas con el micrótopo se depositan sobre agua a 55°C en un baño donde, aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, el calor extiende las secciones sin llegar a su punto de fusión (63°C). Desde ahí, los cortes de tejidos se recogen con la ayuda de un portaobjetos. De manera rutinaria, se recolectan tres secciones de tejido por cada portaobjetos. Las muestras son entonces almacenadas en una caja contenedora de portaobjetos y conservadas a temperatura ambiente.

En el caso de los bloques con resina, los cortes se obtienen en el criostato (Leica CM1510 S) con una cuchilla fría (-20°C). De manera rutinaria, se recolectan de tres a cinco secciones de tejido por cada portaobjetos. Los cortes son entonces almacenados en una caja contenedora de portaobjetos y conservadas a -20°C.

En cualquier caso, el grosor de las secciones va a depender del tipo de técnica al que vayan destinadas esas muestras. En nuestro caso, las muestras destinadas a tinción con hematoxilina-eosina y las de inmunofluorescencias deberán tener un grosor de 3 µm, grosor que se considera óptimo para su posterior análisis de imagen. En el caso de la tinción de Tricrómico de Masson se realizan cortes de 5 µm de espesor, y para la tinción con dihidroetidio (DHE) los cortes deberán tener un grosor de 10 µm.

### **3.8.7. Tinción de hematoxilina-eosina.**

La tinción de hematoxilina-eosina es la coloración utilizada de forma rutinaria en histología para ver la mayoría de los tejidos cuando sólo se quieren observar sus



características, mediante la utilización de un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina). Por afinidad química elemental la hematoxilina, que es básica, se va a unir a componentes ácidos de la célula que están presentes fundamentalmente en el núcleo; y la eosina, que es ácida, se une a componentes básicos, los cuales aparecen ocupando la mayor parte del citoplasma. El contraste entre ambos colorantes nos da una idea general del estado del órgano o tejido.

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, realizándose 3 pases en *Neo-Clear*<sup>®</sup> de 5 minutos cada uno, seguido de un pase de 5 minutos en etanol/*Neo-Clear*<sup>®</sup> (1:1); a continuación, se sumergen en una serie de concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 80% y 70%; 5 minutos en cada caso), seguidos de un lavado en agua corriente durante 5 minutos. A continuación, se procede al proceso de tinción propiamente dicho, en la que se tiñe durante 1 minuto con Hematoxilina de Gill N<sup>o</sup>3, se lava con agua corriente 15 minutos y se sigue con una tinción de una solución alcohólica de eosina amarillenta al 1% durante 15 minutos, pasando finalmente a lavar con agua corriente.

Una vez realizada la tinción, hay que deshidratar y montar la preparación para su posterior conservación. El proceso estándar consiste en someter la preparación a concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a etanol absoluto (70%, 90% y 100%) durante 5 minutos en cada caso. Posteriormente, se aclaran las muestras en *Neo-Clear*<sup>®</sup>, realizando 3 pases de 5 minutos cada uno. Finalmente, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (*Neo-Mount*<sup>®</sup>) con la ayuda de una pinza plana para microscopía, evitando la formación de burbujas.

Como resultado final de esta tinción, los núcleos celulares se observan de un color azul oscuro, mientras que el citoplasma presenta un tono rosáceo.

### **3.8.8. Tinción tricrómica (Masson).**

Uno de los métodos empleados para la visualización del tejido conectivo y muscular es la tinción tricrómica, en la cual se utilizan tres colorantes diferentes. En este caso, se ha utilizado el tricrómico de Masson, que ofrece la ventaja de que puede realizarse en material fijado con formaldehído. De entre los tres colorantes empleados, el azul de anilina permite observar el colágeno en azul, la hematoxilina de Mayer tiñe los núcleos de una coloración roja intensa, y el fucsia de ácido escarlata de Beibrich tiñe el citoplasma y el músculo, presentando finalmente una coloración rosada. Las secciones de tejido se tratan con la solución de Bouin para intensificar la coloración final, y con mordientes como el ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico, que intensifican la afinidad entre el colorante y la célula. El enjuague en ácido acético después de la tinción suaviza la tonalidad del color. Para realizar este ensayo hemos utilizado el kit comercial de tinción Masson Kit HT15-1KT (Sigma Aldrich).

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se procede en primer lugar al desparafinado e hidratación estándar. Seguidamente se sumergen los portaobjetos en solución de Bouin durante 20 minutos, con posterior lavado con agua del grifo hasta que desaparezca la tonalidad amarillenta de los cortes, aproximadamente en unos 5 minutos. A continuación, se procede con la tinción de hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, se aclara con agua bidestilada, y los cortes se sumergen durante 5 minutos en solución de ácido fosfomolibdico-fototúngstico (1:1). Seguidamente se tiñen los portaobjetos con azul de anilina durante 5 minutos, y se realiza un lavado con una solución acuosa de ácido acético glacial al 1% durante 2 minutos. Se procede a continuación a la deshidratación de los cortes, reduciendo los tiempos del protocolo estándar a 20 segundos. Por último, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (*Neo-Mount*<sup>®</sup>) con la ayuda de una pinza plana para microscopía, evitando la formación de burbujas.

### 3.8.9. Tinción fluorescente con dihidroetidio.

Existen multitud de ensayos que permiten detectar la presencia o producción celular del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Se pueden destacar aquellos basados en la quimioluminiscencia, mediante el uso de la lucigenina como indicador de  $O_2^{\cdot-}$  (apartado 3.5.3. de esta sección). Este radical también se puede detectar haciendo uso de luminóforos lipofílicos, como el luminol; o bien mediante ensayos enzimáticos, como la reducción de citocromo c. Otra técnica de detección es el ensayo de fluorescencia, empleando el 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH) o el dihidroetidio (DHE). Aunque los diferentes métodos de detección de  $O_2^{\cdot-}$  han sido cuestionados por algunos autores, la utilización del DHE parece ser la técnica más fidedigna en secciones de tejido vascular.

El compuesto DHE exhibe una fluorescencia azul en el citosol, hasta que se oxida principalmente por el  $O_2^{\cdot-}$  produciendo 2-hidroxi-etidio. En menor medida, el DHE también se oxida de manera no específica por otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, produciendo etidio. Ambos productos se intercalan en el ADN celular, tiñendo el núcleo de un rojo fluorescente brillante, con longitudes de onda de excitación y emisión de 535 nm y 635 nm, respectivamente.

Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar, se dejan descongelar a temperatura ambiente los cortes de tejido embebidos en *Tissue-Tek*<sup>®</sup> *O.C.T.*<sup>™</sup>, y se incuban con DHE 10 mM diluido en PBS 10 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo, se seca el exceso del reactivo con papel de filtro. Finalmente, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje *DAPI Fluoromount-G*<sup>®</sup>, que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); el DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, tiñendo el núcleo de un azul fluorescente brillante con longitudes de onda de excitación y emisión de 358 nm y 461 nm, respectivamente.

Para confirmar la especificidad de la tinción del DHE, se preincubaban los cortes con 100 U/mL de SOD conjugada con polietilenglicol (PEG-SOD) durante 10 minutos a 37°C, y a continuación se prosigue con el resto del protocolo experimental mencionado. Todas las secciones se examinan en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX61) y se fotografían con una cámara digital en color (Olympus DP73). La producción de  $O_2^-$  se ha estimado a partir de la relación de fluorescencia DHE/ DAPI, usando el programa ImageJ versión 2.0.0-rc-69 / 1.52p.

### **3.8.10. Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia (IF) es una técnica basada en el uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente para demostrar la presencia de una determinada molécula. Esta técnica utiliza dos anticuerpos: el anticuerpo primario, que reconoce y se une a la molécula diana; y el secundario, que se une específicamente al primario y está marcado con el fluoróforo. En nuestro caso se realiza una doble inmunofluorescencia, donde por un lado se utiliza un marcador celular específico y por otro lado un marcador de la proteína de estudio. El anticuerpo *anti-CD31* se utiliza para identificar células endoteliales, y el anticuerpo *anti- $\alpha$  smooth muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)* se une específicamente a la actina de las células musculares lisas vasculares (CMLV).

El protocolo estándar para llevar a cabo una doble inmunofluorescencia es el siguiente: en primer lugar, se dejan descongelar a temperatura ambiente los cortes de tejido embebidos en *Tissue-Tek® O.C.T.™*, y se procede a fijar y permeabilizar el tejido con acetona 20 minutos a -20°C; acto seguido, se realizan 3 lavados en PBS 1X de 3 minutos cada uno, y se bloquea incubando en suero bovino 0,5% durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, se incuban las muestras con el primer anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se procede a lavar los cortes en PBS 1X (3 pases de 3 minutos cada uno), y se incuba con el primer anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavan los cortes con PBS 1X (3 pases de 3 minutos cada uno) y se procede a la incubación con el

segundo anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavan los cortes con PBS 1X (3 pases de 3 minutos cada uno) y se incuban con el segundo anticuerpo secundario junto con el marcador de núcleos (DAPI), durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos empleados se han diluido en suero bovino 0,5% (Tabla 3).

Por último, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (*Neo-Mount*<sup>®</sup>) con la ayuda de una pinza plana para microscopía, evitando la formación de burbujas.

<b>Anticuerpos y marcador fluorescente</b>	<b>Dilución</b>
<b><i>Goat polyclonal CD31/PECAM-1 Antibody</i></b>	1:500
<b><i>Rabbit polyclonal anti-CD31</i></b>	1:100
<b><i>Mouse monoclonal anti-Actin, <math>\alpha</math> smooth muscle (<math>\alpha</math>-SMA)</i></b>	1:100
<b><i>Sheep polyclonal anti-Collagen1<math>\alpha</math>1</i></b>	1:200
<b><i>Rabbit polyclonal anti-NOX1</i></b>	1:200
<b><i>Donkey anti-Sheep AF555</i></b>	1:5000
<b><i>Donkey anti-Goat AF647</i></b>	1:5000
<b><i>Goat anti-Rabbit AF546</i></b>	1:5000
<b><i>Goat anti-Rabbit AF647</i></b>	1:5000
<b>DAPI</b>	1:10000

**Tabla 3.** Condiciones de inmunofluorescencia.

### 3.9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en este estudio se han analizado con el programa GraphPad Prism versión 6.07. (GraphPad Software), y aparecen expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Las diferencias en los valores medios entre los grupos se han analizado con la prueba t de Student bilateral para datos no emparejados, considerándose los valores estadísticamente diferentes a partir de  $p < 0,05$ . Los resultados de reactividad vascular previa incubación con inhibidores / vesículas extracelulares, la tinción con DHE, el ensayo de NADPH oxidasa y el ensayo de NO se analizaron mediante ANOVA

unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y se consideraron estadísticamente diferentes a partir de  $p < 0,05$

## **4. RESULTADOS**

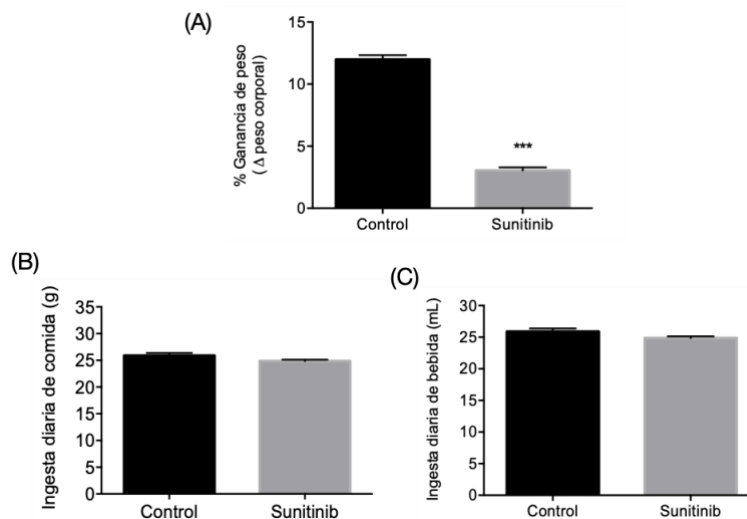




#### 4.1. Características generales de los animales.

##### 4.1.1. Ganancia de peso.

Durante las tres semanas de tratamiento se ha realizado un control semanal del peso corporal de los animales. Al finalizar el tratamiento, los animales tratados con sunitinib (Su) presentaron una ganancia de peso de  $3,04 \pm 0,25$  g, significativamente inferior a la observada en el grupo Control, cuya ganancia de peso fue de  $11,98 \pm 0,35$  g (Figura 15). Esta alteración no se debe a variaciones en la ingesta de comida y bebida, que fue similar en ambos grupos experimentales a lo largo del periodo experimental (Figura 15).

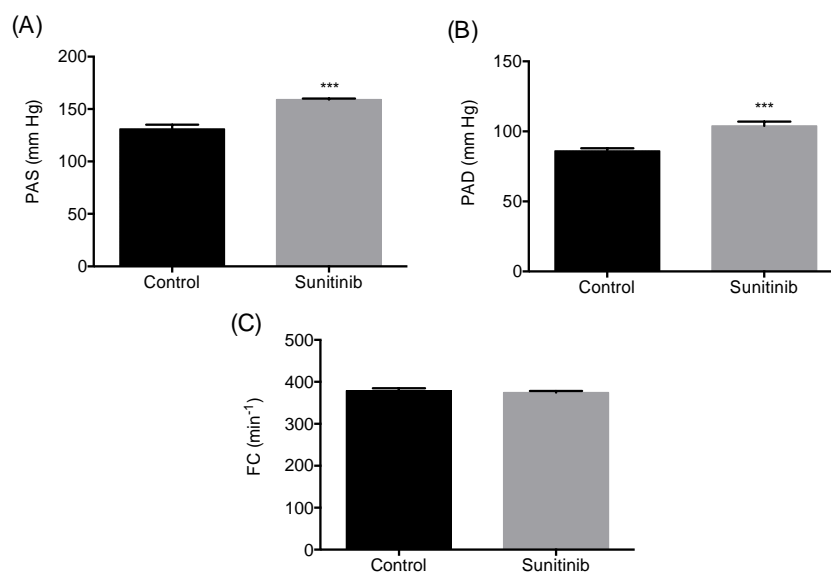


**Figura 15.** Ganancia de peso al final del tratamiento (% relativo al peso inicial del animal) (A), ingesta de comida (g/día) (B) e ingesta de bebida (mL/día) (C) durante el periodo experimental. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de al menos 15 animales en cada grupo ( $n=15$ ). Significación estadística: \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control.

##### 4.1.2. Presión sanguínea.

En la Figura 16 se muestran los valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y de frecuencia cardiaca (FC) al final del tratamiento. Los valores son significativamente mayores en el grupo tratado con Su ( $159 \pm 2$  mm Hg y  $104 \pm 3$  mm Hg para PAS y PAD, respectivamente) con respecto a los valores obtenidos en el grupo Control ( $131 \pm 4$  mm Hg y  $86 \pm 1$  mm Hg para PAS y PAD, respectivamente). Por otro

lado, el tratamiento con Su no indujo alteraciones de la FC, como puede apreciarse en la Figura 16C.



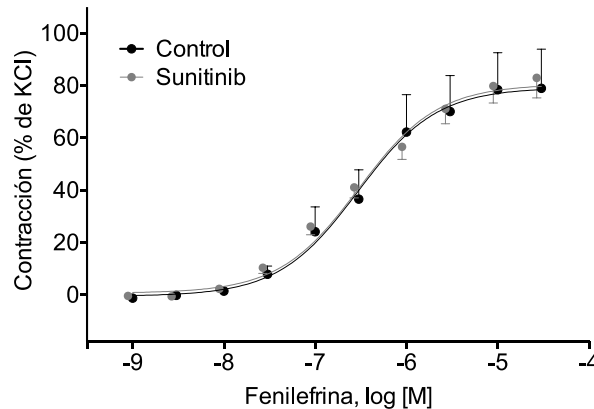
**Figura 16.** Valores de presión arterial sistólica (PAS, A), diastólica (PAD, B) y frecuencia cardíaca (FC, C) al final del periodo experimental. Los resultados se representan como la media  $\pm$  error estándar de al menos 15 animales en cada grupo ( $n=15$ ). Significación estadística: \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control.

#### 4.2. Estudios de reactividad vascular.

Las gráficas presentadas a continuación muestran las curvas dosis-respuesta de las condiciones experimentales anteriormente descritas (apartado 3.4.1 de la sección *Material y Métodos*). La concentración de cada agonista se expresa en escala logarítmica en el eje de abscisas. A partir de dichas gráficas es posible deducir el valor de contracción o relajación máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ; expresado en %) de la aorta después de la adición del fármaco agonista. De igual manera, dichas gráficas permiten deducir el valor de  $pEC_{50}$ , que es el logaritmo negativo de la concentración del agonista (expresada en M) a la cual se produce el 50% de su efecto máximo, y refleja la potencia de dicho agonista.

#### 4.2.1. Contracción inducida por fenilefrina.

La Figura 17 muestra la respuesta vasoconstrictora a dosis crecientes de fenilefrina (Phe). Como puede observarse, la contracción máxima inducida por este agonista alfa-adrenérgico ( $E_{m\acute{a}x}$ ) es similar en ambos grupos de animales, no existiendo tampoco diferencias significativas en cuanto al valor de  $pEC_{50}$  (Tabla 4).



**Figura 17.** Curva dosis-respuesta de vasoconstricción mediada por Phe ( $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ), y están expresados como porcentajes relativos respecto de la contracción máxima inducida por KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) en los correspondientes grupos experimentales.

	Control	Sunitinib
$E_{m\acute{a}x}$ Phe (%)	$79,29 \pm 6,3$	$80,54 \pm 2,8$
$pEC_{50}$ Phe (-log M)	$6,54 \pm 0,19$	$6,52 \pm 0,09$

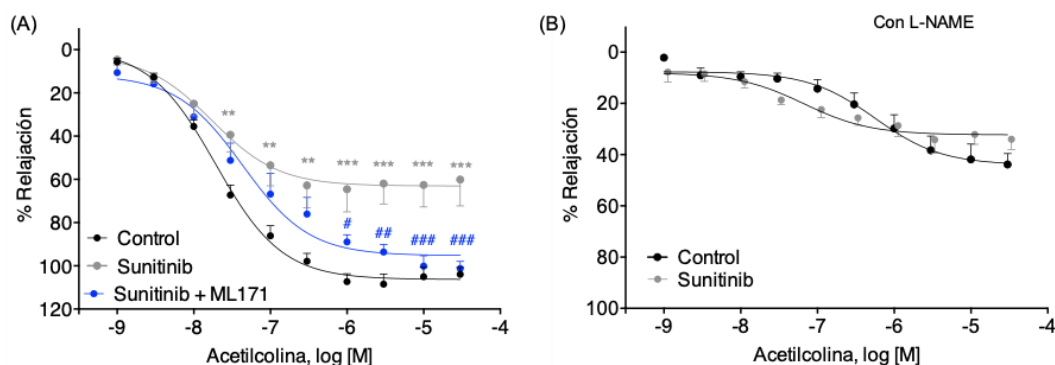
**Tabla 4.** Valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y  $pEC_{50}$  correspondientes a la vasoconstricción inducida por Phe ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ).

#### 4.2.2. Relajación dependiente de endotelio.

La vasodilatación dependiente del endotelio en respuesta a ACh fue significativamente menor en los anillos aórticos de los animales tratados con Su (Figura 18A); así, como se muestra en la Tabla 5A, se observó una disminución significativa en la respuesta máxima vasodilatadora inducida por ACh ( $E_{m\acute{a}x}$ ) en el grupo Su en

comparación con el grupo Control. Sin embargo, los valores de  $pEC_{50}$  para la vasodilatación inducida por ACh fueron similares en ambos grupos experimentales de ratas. Curiosamente, cuando los anillos aórticos de ratas tratadas con Su se incubaron previamente con ML171 (inhibidor de la isoforma NOX1 de la NADPH oxidasa, como comentamos en el apartado 3.5.3 de la sección *Material y Métodos*), el valor de  $E_{m\acute{a}x}$  para la relajación dependiente del endotelio alcanzó valores similares a los del grupo Control, mientras que  $EC_{50}$  no se vio afectado por el inhibidor (Tabla 5A).

Cuando se llevaron a cabo estudios sobre la vasodilatación inducida por ACh en presencia de L-NAME  $10^{-4}$  M, inhibidor de la síntesis de NO (apartado 3.4.1 de la sección *Material y Métodos*), los dos grupos de estudio (Control y Sunitinib) experimentaron una disminución equivalente en la respuesta vasodilatadora (Figura 18B), con unos valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y de  $pEC_{50}$  similares en ambos casos (Tabla 5B).



**Figura 18.** Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por ACh ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M), incluida la preincubación durante 30 minutos con ML171 ( $10^{-4}$  M) (A). Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por acetilcolina ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) tras preincubar con L-NAME ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos (B). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ), y están expresados como porcentajes de relajación respecto de la precontracción inducida por fenilefrina (a dosis submáxima,  $3 \times 10^{-6}$  M) en cada uno de los grupos experimentales. Significación estadística: \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs. grupo Su.

(A)	Control	Sunitinib	Sunitinib + ML171
<b>E<sub>máx</sub> ACh (%)</b>	106 ± 1,7	63 ± 3,8 <sup>***</sup>	95,3 ± 2,98 <sup>###</sup>
<b>pEC<sub>50</sub> ACh (-log M)</b>	7,72 ± 0,06	7,76 ± 0,24	7,36 ± 0,11

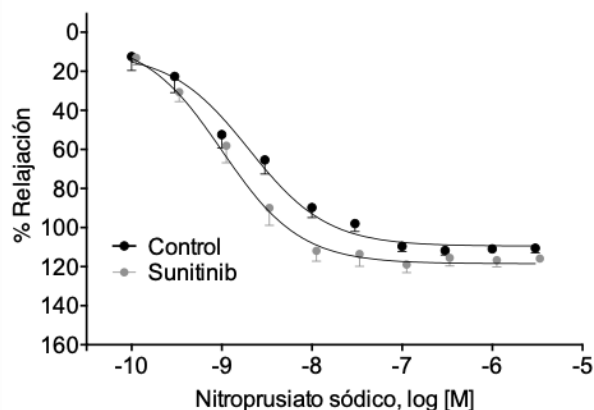
  

(B)	Control	Sunitinib
<b>E<sub>máx</sub> ACh (%)</b>	44 ± 2,88	32,3 ± 1,93
<b>pEC<sub>50</sub> ACh (-log M)</b>	6,25 ± 0,18	7,17 ± 0,23

**Tabla 5.** Valores de  $E_{máx}$  y  $pEC_{50}$  correspondientes a la vasodilatación mediada por ACh ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en ausencia (A) o en presencia (B) de L-NAME ( $10^{-4}$  M) durante 30 minutos, en anillos aórticos precontraídos con Phe ( $3 \times 10^{-6}$  M) y procedentes de ratas control y de ratas tratadas con Su. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ). Significación estadística: <sup>\*\*\*</sup> $p < 0,001$  vs. grupo Control; <sup>###</sup> $p < 0,001$  vs. grupo Su.

#### 4.2.3. Relajación independiente de endotelio.

El nitroprusiato sódico (NPS) es un donador de NO que, al actuar directamente sobre las células de la musculatura lisa, es capaz de provocar una vasodilatación independiente de endotelio (apartado 3.4.1 de la sección *Material y Métodos*). Los resultados relativos a la vasorrelajación independiente de endotelio no mostraron cambios significativos entre los grupos Control y Su en los parámetros  $E_{máx}$  o  $pEC_{50}$  (Figura 19 y Tabla 6).



**Figura 19.** Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ -  $3 \times 10^{-6}$  M). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ), y están expresados como porcentajes de relajación respecto de la precontracción inducida por fenilefrina ( $3 \times 10^{-6}$  M) en los dos grupos experimentales.

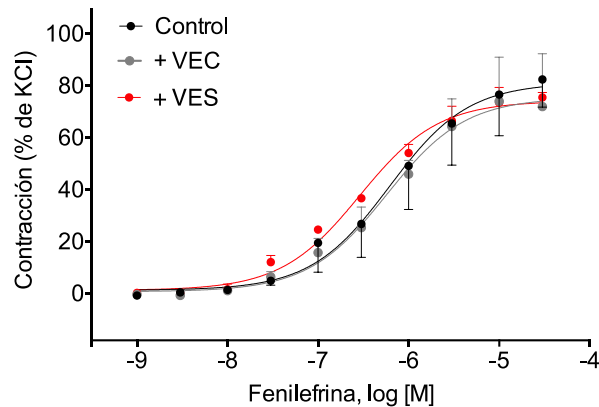
	Control	Sunitinib
<b><math>E_{m\acute{a}x}</math> NPS (%)</b>	109 $\pm$ 2,4	118,5 $\pm$ 3,09
<b>pEC<sub>50</sub> NPS (-log M)</b>	8,7 $\pm$ 0,09	8,9 $\pm$ 0,09

**Tabla 6.** Valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y pEC<sub>50</sub> correspondientes a la vasodilatación inducida por NPS ( $10^{-10}$ -  $3 \times 10^{-6}$  M) en anillos aórticos precontraídos con una dosis submáxima de Phe ( $3 \times 10^{-6}$  M), procedentes de ratas Control y de ratas tratadas con Su. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 6 experimentos ( $n=6-12$ ).

#### 4.3. Efecto de la preincubación con vesículas extracelulares sobre la reactividad vascular.

##### 4.3.1. Contracción inducida por fenilefrina previa incubación con vesículas extracelulares.

En la Figura 20 se aprecia que la adición de vesículas extracelulares (VE) circulantes, procedentes tanto de ratas control como de ratas tratadas con Su, a aortas extraídas de ratas control, no afectaron la respuesta vasoconstrictora a dosis crecientes de fenilefrina, no existiendo diferencias significativas en la contracción máxima ( $E_{m\acute{a}x}$ ) inducida por este agonista alfa-adrenérgico entre los diferentes grupos de animales (Tabla 7).



**Figura 20.** Curva dosis-respuesta de vasoconstricción mediada por Phe ( $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M). + VEC: preincubación con VE procedentes de ratas control; + VES: preincubación con VE procedentes de ratas tratadas con Su. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 4 experimentos ( $n=4$ ), y están expresados como porcentajes relativos respecto de la contracción máxima inducida por KCl ( $6 \times 10^{-2}$  M) en los correspondientes grupos experimentales.

	Control	+ VEC	+ VES
<b><math>E_{m\acute{a}x}</math> Phe (%)</b>	75,09 $\pm$ 7,44	75,48 $\pm$ 6,29	74,18 $\pm$ 2,07
<b><math>pEC_{50}</math> Phe (-log M)</b>	6,32 $\pm$ 0,23	6,24 $\pm$ 0,19	6,54 $\pm$ 0,1

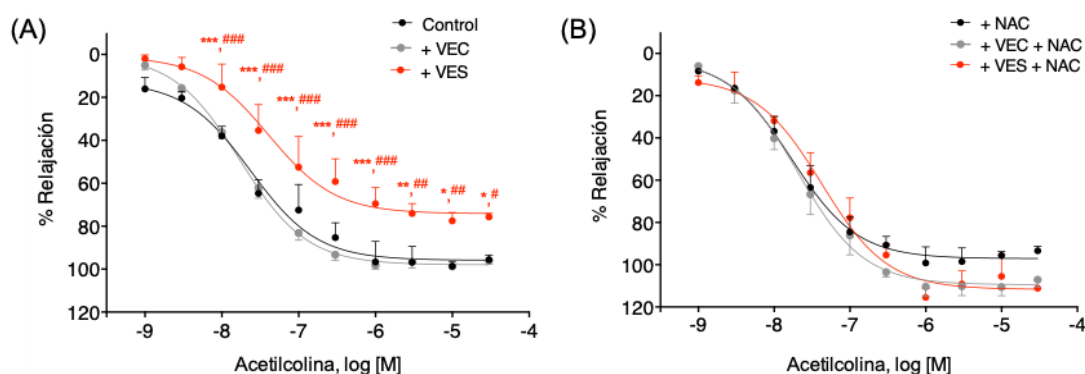
**Tabla 7.** Valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y  $pEC_{50}$  correspondientes a la vasoconstricción inducida por Phe ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en ausencia y en presencia de vesículas extracelulares (VE). + VEC: preincubación con VE procedentes de ratas control; + VES: preincubación con VE procedentes de ratas tratadas con Su. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 4 experimentos ( $n=4$ ).

#### 4.3.2. Relajación dependiente de endotelio previa incubación con vesículas extracelulares.

La vasodilatación dependiente de endotelio en respuesta a ACh fue significativamente menor en los anillos aórticos de ratas control preincubados con vesículas extracelulares circulantes procedentes de ratas tratadas con Su (+ VES) (Figura 21A); como se muestra en la Tabla 8A, se observó una disminución significativa en la respuesta vasodilatadora máxima inducida por ACh ( $E_{m\acute{a}x}$ ) en estos anillos en

comparación con los grupos Control y + VEC. Además, el valor de  $pEC_{50}$  para la vasodilatación inducida por ACh disminuyó significativamente en el grupo + VES con respecto al grupo Control y + VEC.

Cuando se llevaron a cabo los mismos estudios sobre la vasodilatación inducida por ACh, pero en presencia de NAC  $10^{-6}$  M, sustancia antioxidante (apartado 3.4.1 de la sección *Material y Métodos*), se observó una respuesta similar en los tres grupos experimentales (Figura 21B). En la Tabla 8B se muestran los valores específicos de  $E_{máx}$  y  $pEC_{50}$  en estas condiciones, donde se observó un aumento significativo en la respuesta vasodilatadora máxima inducida por ACh ( $E_{máx}$ ) de los grupos + VEC/NAC y + VES/NAC, con respecto a la respuesta vasodilatadora máxima observada previamente en los grupos + VEC y + VES, respectivamente.



**Figura 21.** Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por ACh ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) en ausencia y en presencia de VE (A). Curva dosis-respuesta de vasodilatación mediada por acetilcolina ( $10^{-9}$ - $3 \times 10^{-5}$  M) tras preincubar con NAC ( $10^{-6}$  M) durante 30 minutos (B). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  error estándar de al menos 4 experimentos ( $n=4$ ), y están expresados como porcentajes de relajación respecto de la precontracción inducida por fenilefrina (a dosis submáxima,  $3 \times 10^{-6}$  M) en cada uno de los grupos experimentales. Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  vs. + VEC.



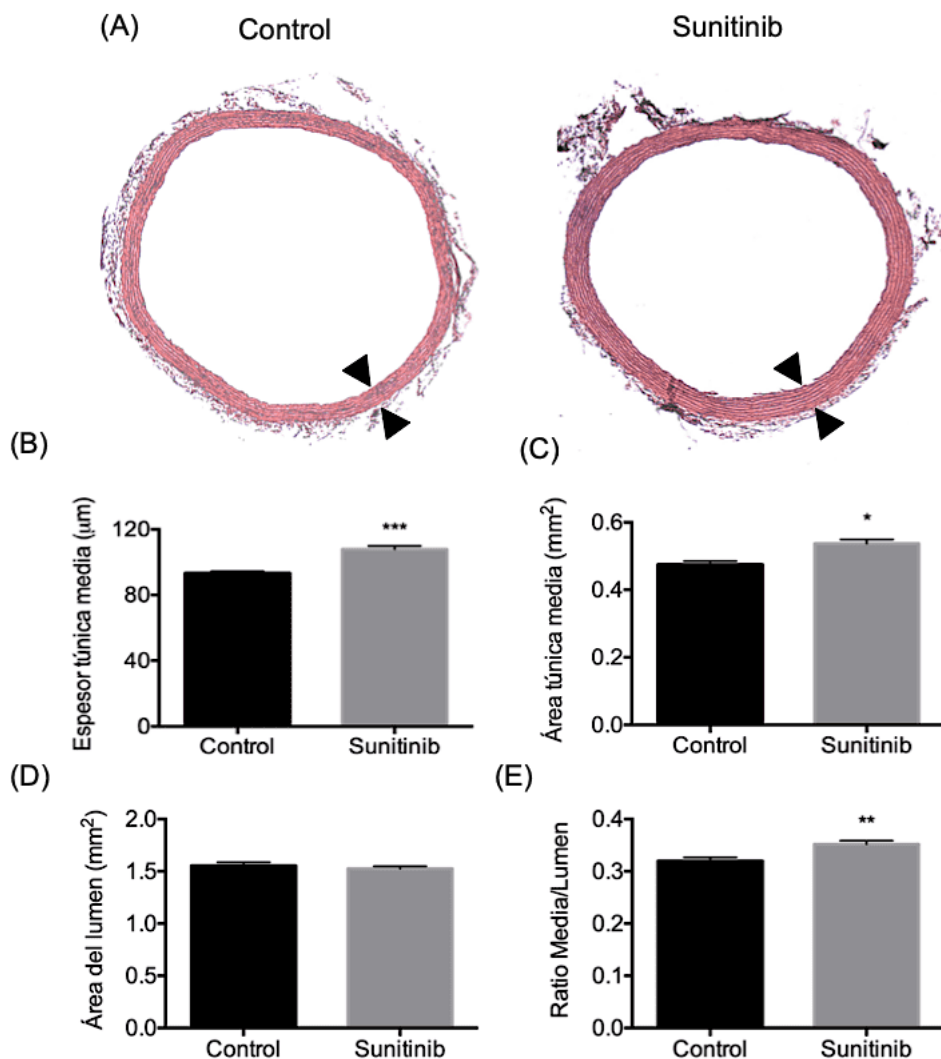
	Control	+ VEC	+ VES	+ NAC		
				Control	+ VEC	+ VES
$E_{m\acute{a}x}$ ACh (%)	94,5 ± 2,9	99,41 ± 1,7	76 ± 4,58 **,##	97,1 ± 2,39	109,5 ± 2,72 #	111,70 ± 3,78 †††
$pEC_{50}$ ACh (-log M)	7,68 ± 0,13	7,77 ± 0,07	7,05 ± 0,18 *,#	7,77 ± 0,10	7,68 ± 0,09	7,37 ± 0,10

**Tabla 8.** Valores de  $E_{m\acute{a}x}$  y  $pEC_{50}$  correspondientes a la vasodilatación mediada por ACh ( $10^{-9}$ -  $3 \times 10^{-5}$  M) previa incubación con VE durante 1 hora y 30 minutos, en ausencia y en presencia de NAC ( $10^{-6}$  M), en anillos aórticos de ratas control precontraídos con Phe ( $3 \times 10^{-6}$  M). Los resultados corresponden a la media ± error estándar de al menos 4 experimentos ( $n=4$ ). + VEC: preincubación con VE procedentes de ratas control; + VES: preincubación con VE procedentes de ratas tratadas con Su. Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  vs. Control; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  vs. + VEC; ††† $p < 0,001$  vs. + VES.

#### 4.4. Estudio histomorfométrico y fibrótico de la aorta.

##### 4.4.1. Tinción de hematoxilina-eosina.

Las micrografías de la Figura 22 corresponden a cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina representativos de aortas de los dos grupos experimentales de animales. Como puede observarse, en la imagen correspondiente al grupo Su se aprecia un engrosamiento de la túnica media con respecto a la imagen del grupo Control (Figura 22A). Este engrosamiento da lugar a un aumento significativo en el espesor de la túnica media (Figura 22B), así como el área de la túnica media (Figura 22C) y en la ratio media/lumen (Figura 22E), en las ratas tratadas con Su respecto a las ratas control; si bien no se encontraron diferencias en el área del lumen *per se* (Figura 22D). Estos resultados indican que las aortas provenientes de ratas tratadas con Su sufren un remodelado vascular hipertrófico, como se describió previamente (apartado 1.4.1 de la sección *Introducción*).

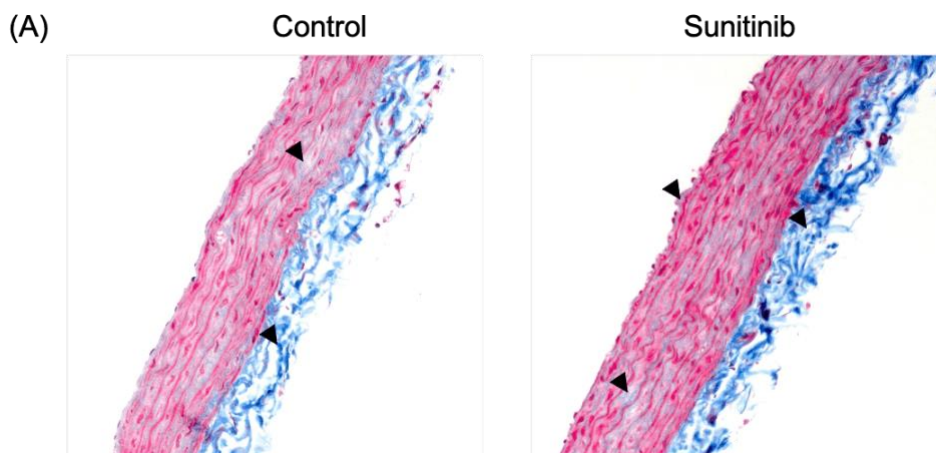


**Figura 22.** Tinción hematoxilina-eosina en aorta de ambos grupos experimentales de animales (A). Las flechas (▲, ▼) delimitan la túnica media. Aumento: 2.5x. Espesor de la túnica media (B); área de la túnica media (C); área del lumen (D) y ratio media/lumen (E). Los valores de las gráficas se han calculado sobre secciones transversales de anillos aórticos, y representan la media  $\pm$  S.E.M de al menos 6 animales en cada grupo ( $n=6$ ). Significación estadística: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$  vs. grupo Control.

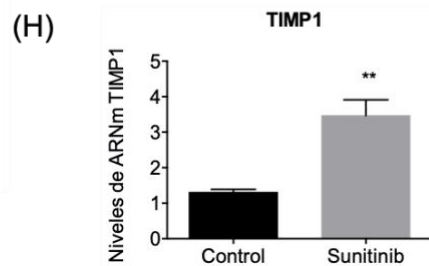
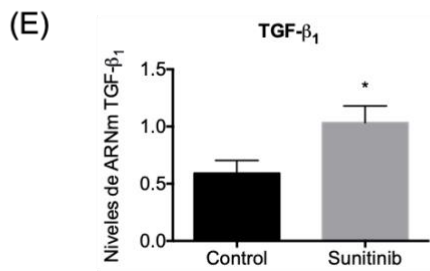
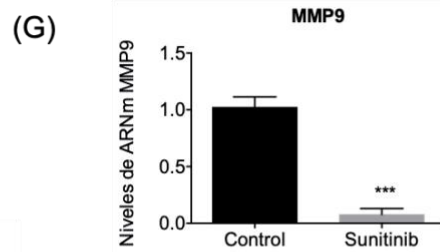
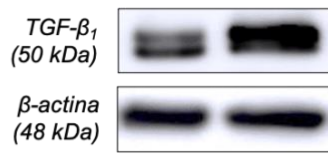
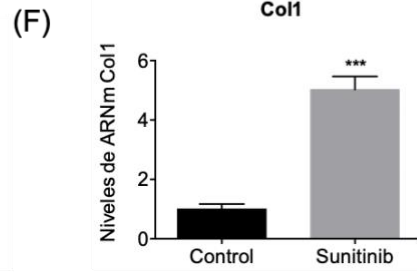
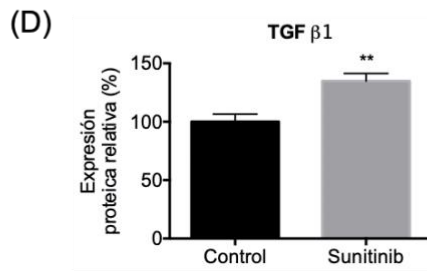
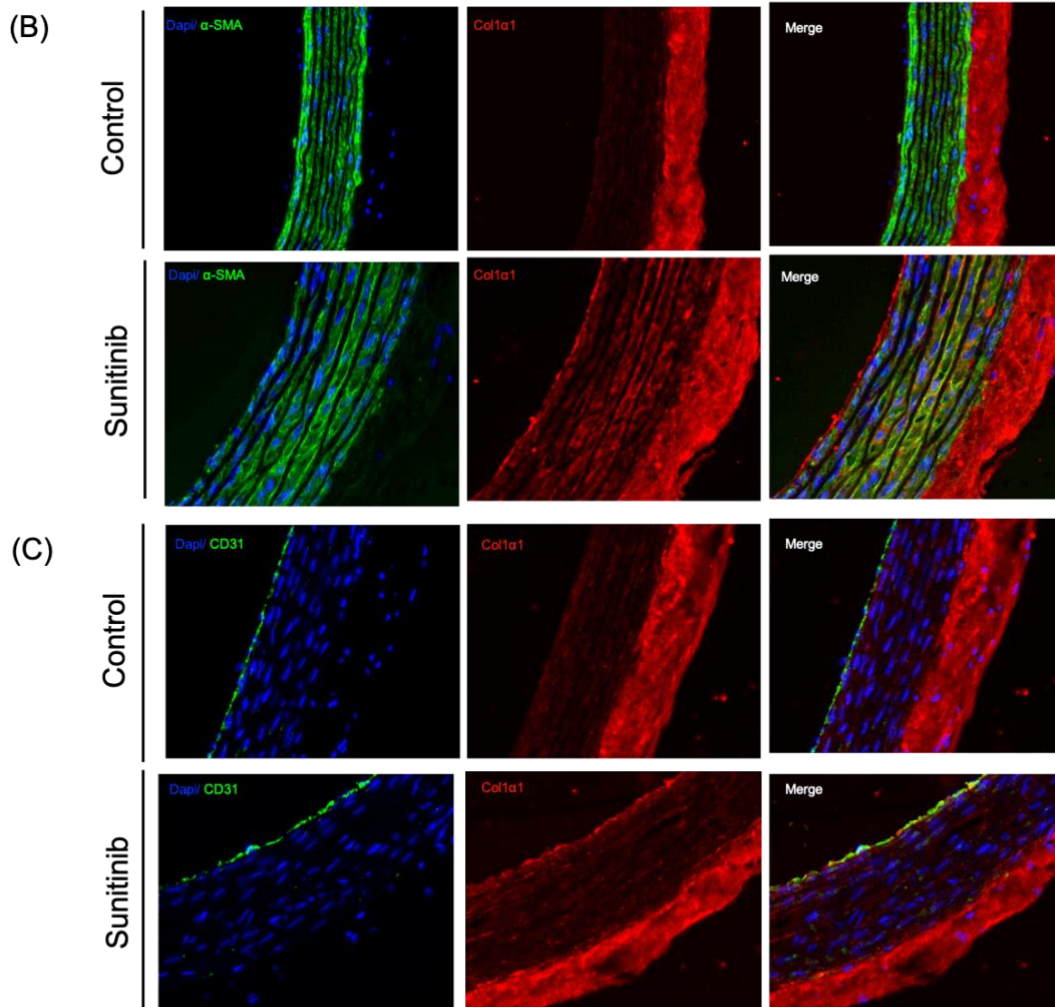
#### 4.4.2. Fibrosis: tinción con tricrómico de Masson. Presencia y localización de colágeno tipo I. Expresión génica y proteica de factores (pro) fibróticos.

La tinción tricrómica de Masson mostró una coloración azul ligeramente intensificada en las aortas de las ratas tratadas con Su, indicando un mayor contenido total de colágeno en estas aortas (Figura 23A). La isoforma de colágeno 1 alfa 1

(Col1 $\alpha$ 1) se expresa *per se* abundantemente en la túnica adventicia del tejido vascular aórtico en ambos grupos experimentales (Figura 23B). Sin embargo, los anillos aórticos de ratas tratadas con Su también mostraron marcaje Col1 $\alpha$ 1 positivo en la túnica media y en la túnica íntima (membrana basal y matriz extracelular de células endoteliales) (Figura 23C). Estos resultados indican un amplio depósito de colágeno en las tres capas que comprenden la aorta en el grupo tratado con Su con respecto al grupo Control. Además, la expresión de ARNm de Col1 y la expresión proteica y génica de TGF- $\beta$ 1 también aumentan en las aortas de las ratas tratadas (Figura 23D-F). Acompañando a estos resultados, se muestran las expresiones génicas de la MMP9 y el TIMP1, las cuales se ven disminuida y aumentada, respectivamente, en las ratas tratadas con Su con respecto a las ratas Controles (Figura 23G-H). Todos estos resultados sugieren una mayor presencia de fibrosis en las aortas de las ratas tratadas con Su con respecto al grupo Control.



**Fig. 23 Cont.**

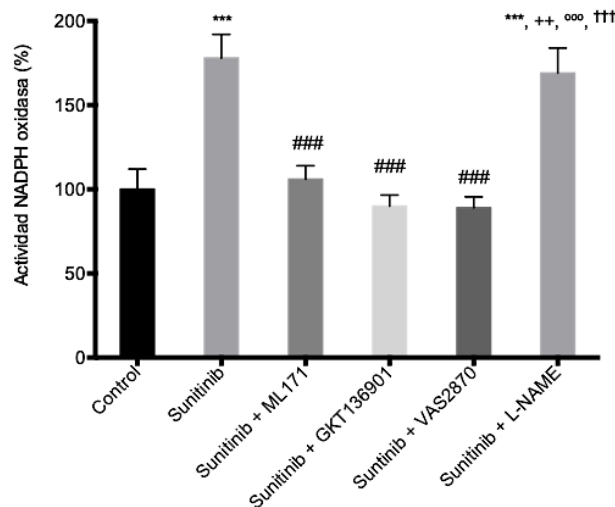


**Figura 23.** Tinción tricrómica de Masson para las fibras de colágeno en azul (marcadas con punta de flecha) (A). Doble inmunofluorescencia de Col1 $\alpha$ 1 (rojo) y  $\alpha$ -SMA (CMLV) (verde) (B). Doble inmunofluorescencia de Col1 $\alpha$ 1 (rojo) y CD31 (verde) (C). Expresión de TGF- $\beta$ 1 a nivel proteico (D) y génico (E). Expresión génica de Col1 (F), MMP9 (G) y TIMP1 (H) en aortas de ratas control y tratadas con Su. Aumento: 10x para la tinción tricrómica de Masson; 40x para las inmunofluorescencias. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos 6 animales por grupo (n=6-8). Significación estadística: \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001 vs. grupo Control.

#### 4.5. Estado oxidativo vascular.

##### 4.5.1. Actividad de la enzima NADPH oxidasa.

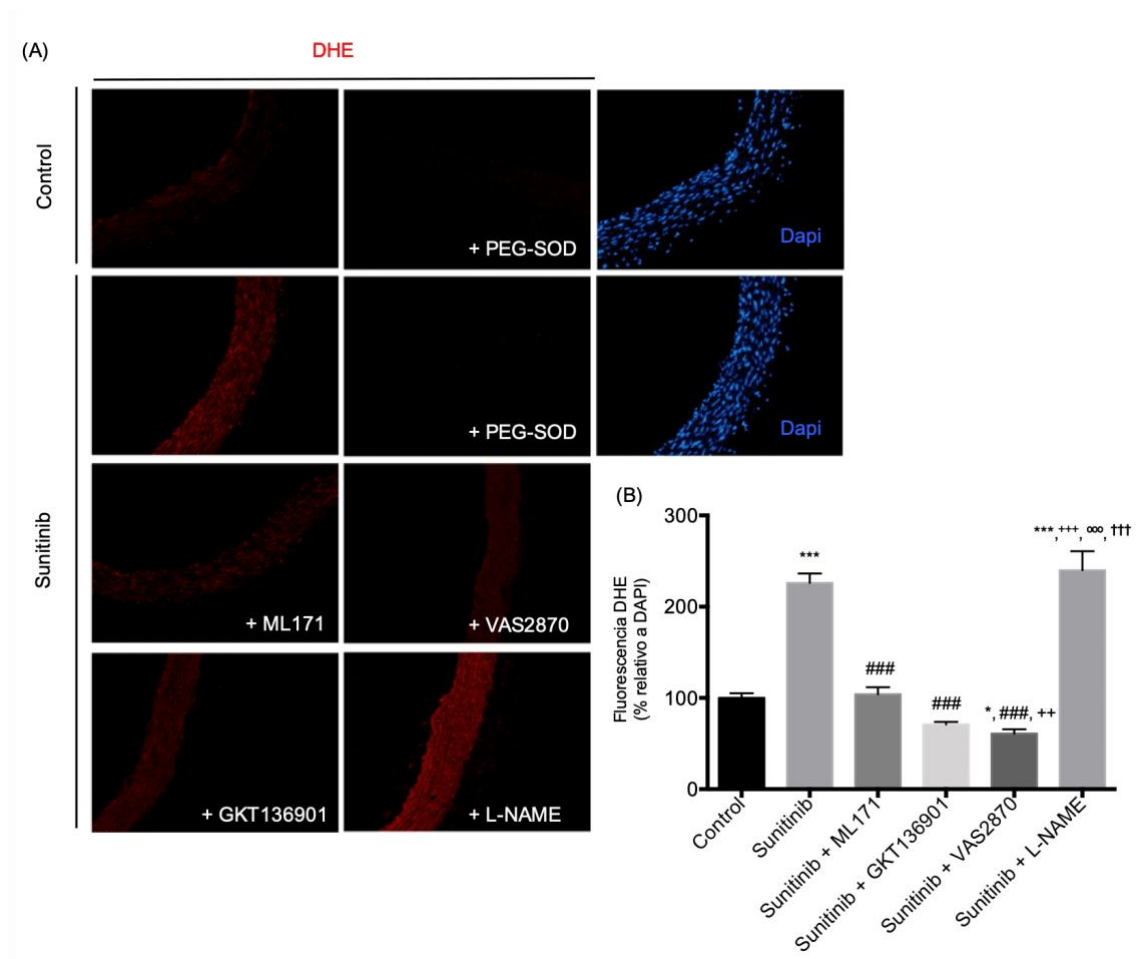
La actividad de la enzima NADPH oxidasa aumentó en las aortas de las ratas tratadas con Su en comparación con el grupo de Control (Figura 24). Los inhibidores de NADPH oxidasa (ML171, GKT136901 y VAS2870) redujeron la actividad de dicha enzima hasta valores controles. Por otro lado, el L-NAME no tuvo efecto sobre la actividad de la NADPH oxidasa en ratas tratadas con Su.



**Figura 24.** Actividad de la enzima NADPH oxidasa en homogeneizados de aorta. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos 8 animales por grupo (n=8). Significación estadística: \*\*\* $p$ <0,001 vs. grupo Control; ### $p$ <0,001 vs. grupo Sunitinib; ++ $p$ <0,01 vs. grupo Sunitinib + ML171; ooo $p$ <0,001 vs. grupo Sunitinib + GKT136901; ttt $p$ <0,001 vs. grupo Sunitinib + VAS2870.

#### 4.5.2. Tinción fluorescente de dihidroetidio.

Las imágenes de DHE (color rojo) mostraron un aumento significativo en la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en aortas de ratas sometidas a tratamiento con Su, en comparación con el grupo Control (Figura 25 A y B). Cuando las preparaciones de anillo aórtico se preincubaron con PEG-SOD, la tinción con DHE desapareció, confirmando la presencia de  $O_2^{\cdot-}$ . Además, en los segmentos aórticos procedentes de animales tratados con Su, la preincubación con inhibidores de la NADPH oxidasa resultó nuevamente en una atenuación de la formación de anión superóxido, llegando a niveles similares a los medidos en el grupo Control. Por otro lado, no se observó ningún cambio en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  después de la incubación de los anillos de animales tratados con Su con el inhibidor de eNOS, L-NAME (Figura 25 A y B).

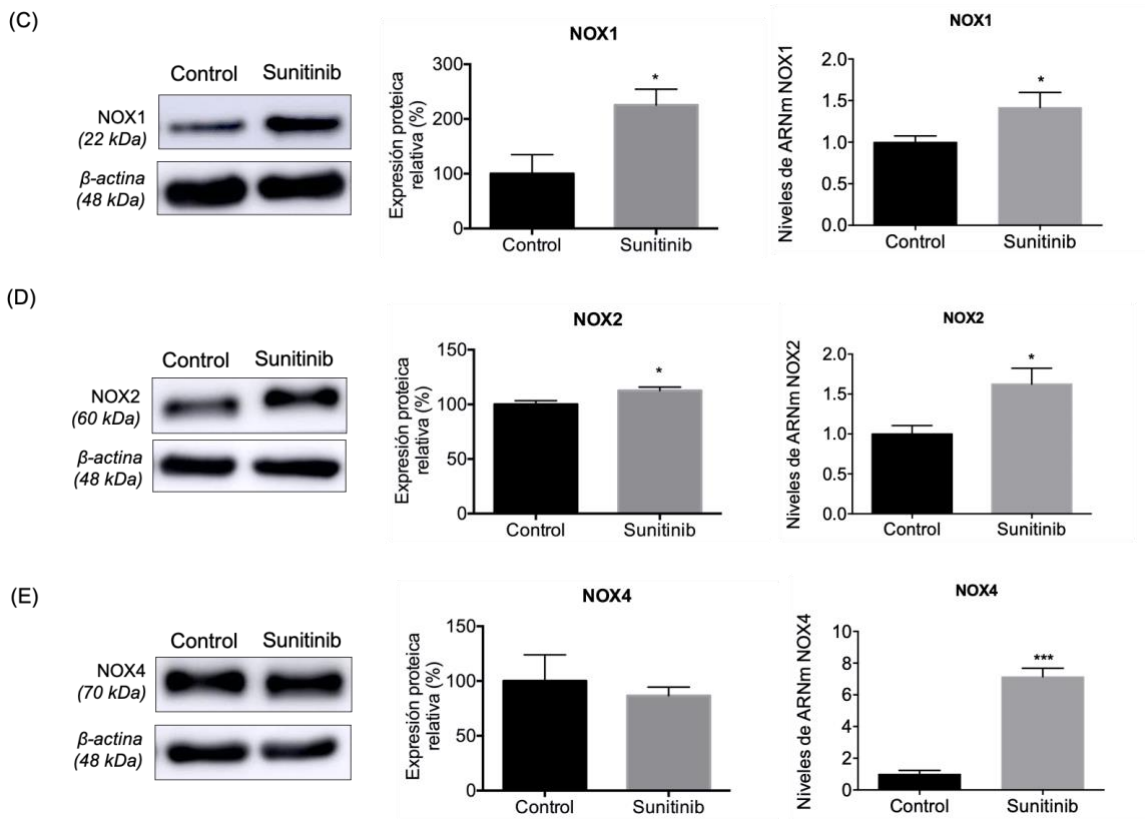
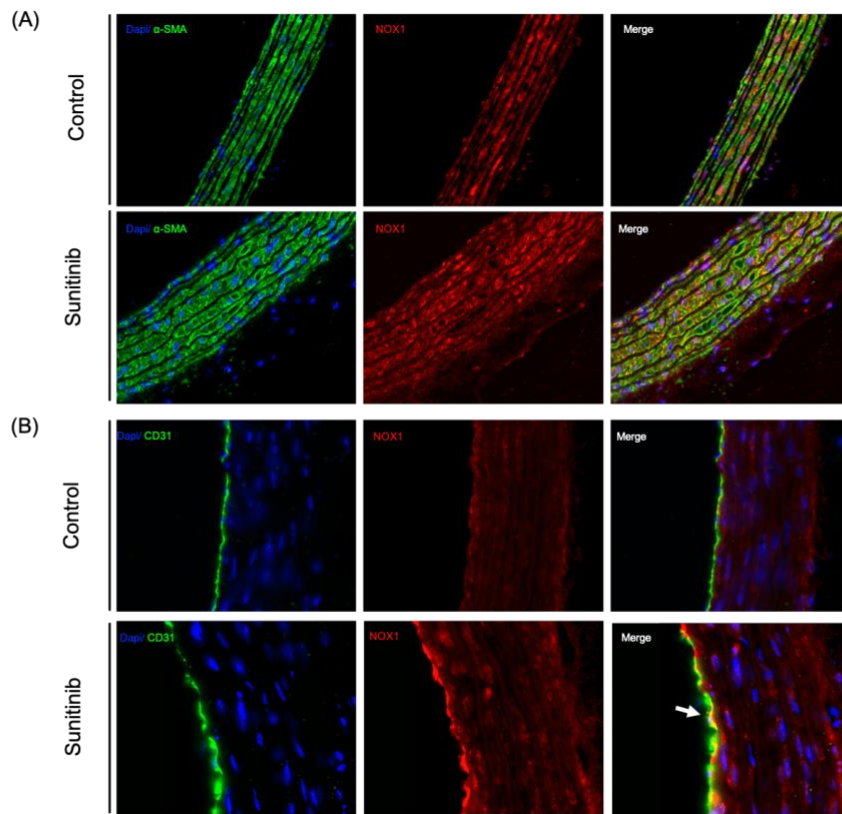


**Figura 25.** Producción de anión superóxido en aortas torácicas. Tinción representativa de DAPI (azul) y DHE (rojo) (A), y cuantificación del anión superóxido (B). Aumento: 10x. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos 6 animales por grupo ( $n=6$ ).

Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control; ### $p < 0,001$  vs. grupo Sunitinib; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Sunitinib + ML171; °°° $p < 0,001$  vs. grupo Sunitinib + GKT136901; ††† $p < 0,001$  vs. grupo Sunitinib + VAS2870.

#### 4.5.3. Localización y expresión génica y proteica de las isoformas de la NADPH oxidasa.

La doble inmunofluorescencia de la isoforma NOX1 de la enzima NADPH oxidasa (rojo) y  $\alpha$ -SMA (verde) mostró que NOX1 se encuentra tanto en el interior de CMLV como en la túnica adventicia en aortas de ambos grupos experimentales de animales, siendo el marcaje NOX1 positivo mucho más notable en el grupo Sunitinib (Figura 26A). El doble marcaje de NOX1 (rojo) y CD31 (verde) mostró la colocalización de NOX1 dentro de las células endoteliales en aortas de ratas tratadas con Su, pero no en las controles (Figura 26B). En consecuencia, se observó un aumento de la presencia de NOX1 en las tres capas vasculares de las aortas procedentes de ratas sometidas a tratamiento con Su. Estos resultados están bien relacionados con el aumento observado en la expresión génica y proteica de NOX1 y NOX2 en las aortas de estas ratas, como muestra en la Figura 26C y D. En cuanto a la isoforma NOX4, aunque el tratamiento con Su también mostró un aumento significativo en la expresión génica de esta isoforma NADPH, no se observaron cambios significativos entre ambos grupos de animales en la cantidad relativa de proteína estimada a partir del análisis de *Western blotting* (Figura 26E).

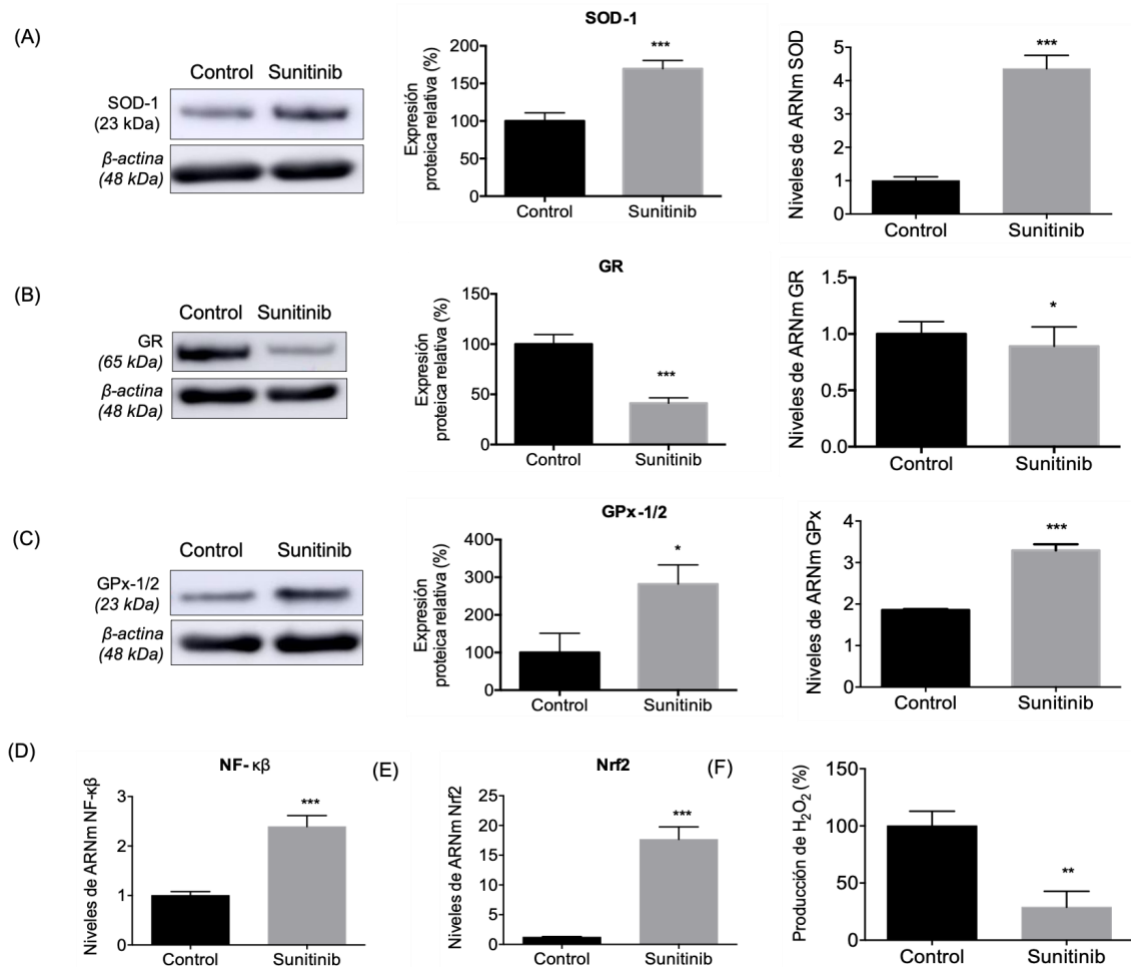




**Figura 26.** Doble inmunofluorescencia de NOX1 (rojo) y  $\alpha$ -SMA (CMLV) (verde) (A), y NOX1 (rojo) y CD31 (verde)(B) en aortas de ratas control y de ratas tratadas con Su. Aumento: 40x (A) y 100x (B). (C-E) Expresión proteica y génica de NOX1, NOX2 y NOX4, respectivamente. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos 6 animales por grupo (n=6-8). Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control.

#### 4.5.4. Expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes, producción de peróxido de hidrógeno y expresión de NF- $\kappa$ B y Nrf2.

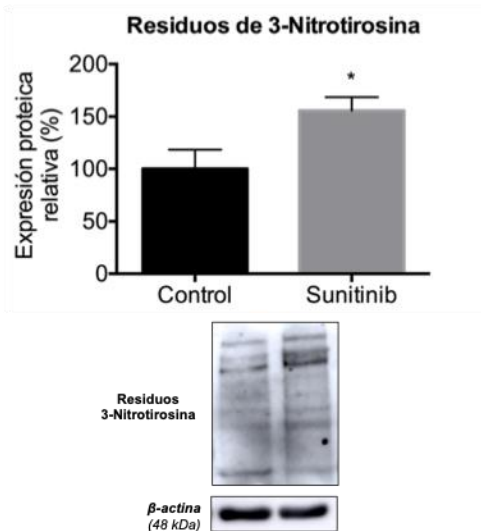
Con el fin de explorar si el tratamiento con Su produce modificaciones a nivel génico y/o proteico de las enzimas antioxidantes SOD, GR y GPx, se realizaron ensayos de *Western blotting* y PCR a tiempo real. Como se puede observar en la Figura 27, el fármaco induce un incremento significativo en la expresión proteica y génica de las enzimas SOD y GPx en los animales tratados (Figuras 27A y 27C, respectivamente). Sin embargo, esto no sucede con la enzima GR, cuya expresión proteica se ve significativamente disminuida a la mitad si se compara con el grupo Control (Figura 27B). En el caso de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Nrf2, implicados en inflamación y estrechamente ligados al estrés oxidativo (apartado 1.3.1. de la sección *Introducción*), se observa un aumento significativo en la expresión génica de ambos tras el tratamiento con Su (Figura 27D y 27E, respectivamente). Por su parte, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en animales tratados con Su disminuyó más del 50% con respecto al grupo Control (Figura 27F).



**Figura 27.** Expresión proteica y génica de SOD, GR, GPx (A-C). Expresión génica de NF-κB (D) y Nrf2 (E). Cuantificación de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (F). Los valores se expresan como media ± S.E.M. de al menos 6 animales por grupo. Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control.

#### 4.5.5. Grado de nitrosilación de proteínas.

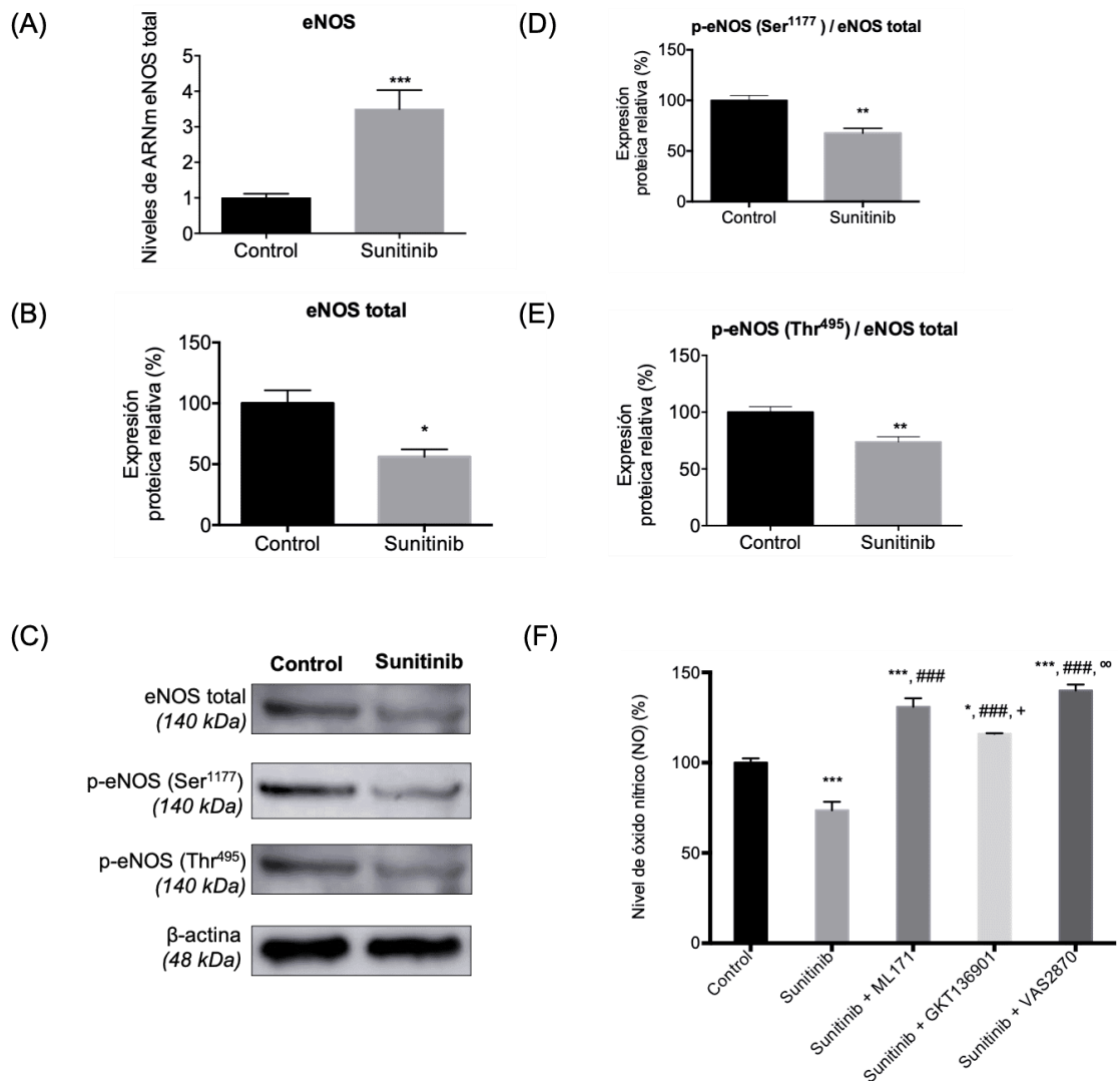
Mediante el uso de la nitrotirosina como marcador de estrés oxidativo en aorta de rata, hemos demostrado un aumento significativo en el contenido de residuos de 3-nitrotirosina en las proteínas procedentes de las ratas tratadas con Su, con respecto al grupo Control (Figura 28).



**Figura 28.** Expresión proteica de los residuos de 3-nitrotirosina en homogeneizados de aorta de ratas control y de ratas tratadas con Su. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de al menos 6 animales por grupo. Significación estadística: \* $p < 0,05$  vs. grupo Control.

#### 4.5.6. Expresión génica y proteica, y grado de fosforilación, de la eNOS.

Los experimentos de expresión génica y proteica y del grado de fosforilación de la eNOS, revelaron un aumento en la expresión génica de esta enzima en animales tratados con Su (Figura 29A). Sin embargo, a nivel proteico se observó una disminución en la expresión total de esta proteína, junto con una disminución de la fosforilación de eNOS en Ser<sup>1177</sup> y Thr<sup>495</sup> (Figura 29B y C) en el grupo de animales tratados con Su. Cuando se determinó la relación p-Ser<sup>1177</sup> eNOS / total eNOS y p-Thr<sup>495</sup> eNOS / total eNOS, se observó una reducción en ambos parámetros en ratas sometidas a tratamiento con Su (Figura 29D y E). Además, los niveles de NO mostraron una disminución en homogeneizados de aorta procedentes de animales tratados con Su; alteración que se revirtió a niveles suprafisiológicos tras la preincubación con los inhibidores de NOX (Figura 29F).



**Figura 29.** Expresión génica de eNOS (A). Cuantificación relativa de la expresión proteica de eNOS (B). Imágenes de Western blotting que muestran la expresión proteica de p-eNOS (Ser<sup>1177</sup>), p-eNOS (Thr<sup>495</sup>) y eNOS total (C). Relación p-eNOS (Ser<sup>1177</sup>)/eNOS total (D) y relación p-eNOS (Thr<sup>495</sup>)/ eNOS total (E). Detección de los niveles de NO (F) en aortas de animales controles y de animales tratados con Su. Los valores se expresan como media S.E.M. de al menos 6 animales por grupo. Significación estadística: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo Control; ### $p < 0,001$  vs. grupo Sunitinib; + $p < 0,05$  vs. grupo Sunitinib + ML171; ∞ $p < 0,01$  vs. grupo Sunitinib + GKT136901.

## **5. DISCUSIÓN**



### **5.1. Características del tratamiento con inhibidores tirosina quinasa. Efectos adversos.**

La expresión anormal de las proteínas tirosina quinasa conduce a trastornos en la regulación de la proliferación celular que son responsables de la génesis del tumor, invasión tumoral, metástasis, neovascularización tumoral y resistencia a la quimioterapia tumoral. Por tanto, estas proteínas son un objetivo claro para la investigación y el desarrollo de fármacos antineoplásicos<sup>93</sup>. No obstante, a pesar del magnífico potencial que ofrecen estas dianas terapéuticas, son muchos los estudios que han demostrado también una clara correlación entre la terapia con ITQ y el desarrollo de toxicidad cardiovascular, donde se incluye la HTA como un efecto secundario común de los inhibidores de receptores de VEGF utilizados en la terapia contra el cáncer; un ejemplo de ellos es el sunitinib<sup>94</sup>, fármaco objeto del presente estudio.

La inhibición del receptor VEGF (VEGFR) puede abordarse farmacológicamente de manera extracelular o intracelular. El primer enfoque implica el uso de anticuerpos monoclonales que se unen a los ligandos o al dominio extracelular del VEGFR; es el caso de los fármacos bevacizumab (antagonista de VEGF-A), aflibercept (que puede neutralizar a VEGF-A, VEGF-B y factor de crecimiento placentario) y ramucirumab (que se une a VEGFR-2). El segundo enfoque comprende inhibidores de la actividad de tirosina quinasa del dominio intracelular de VEGFR; en este caso no se trata de una unión específica, debido a los múltiples perfiles de inhibición de los distintos ITQ. Generalmente, tras el tratamiento con un ITQ se produce un aumento de la presión arterial, cuyo grado puede variar dependiendo de los límites de presión arterial considerados en las diferentes guías de práctica clínica<sup>93</sup>.

Muchos pacientes que reciben terapia con inhibidores de VEGFR lo hacen durante un periodo corto de tiempo y tienen una esperanza de vida corta, lo cual pone en duda la necesidad de tratar la HTA inducida que aparece en dichos pacientes. En algunos casos se disminuye la dosis de ITQ o bien se interrumpe el tratamiento, en cuyo

caso se recomienda emplear un inhibidor VEGFR diferente. Sin embargo, esto puede resultar en una disminución de la supervivencia general, así como en el padecimiento de HTA inducida tras dicha terapia. Además, otras patologías como la HTA refractaria, crisis hipertensivas, HTA grave, proteinuria y daño renal agudo pueden aparecer tras el tratamiento con ITQ. Datos recientes sugieren que el tratamiento de la HTA puede conducir a una mejora en la supervivencia libre de progresión del cáncer y a una reducción en el riesgo de padecer otras enfermedades cardiovasculares asociadas a la terapia con ITQ, como enfermedad trombotica arterial, miocardiopatía y cardiopatía isquémica <sup>7</sup>. De hecho, la HTA no tratada es un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) con alta tasa de mortalidad, incluyendo angina estable e inestable, hemorragia subaracnoidea/intracerebral, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, muerte cardiaca súbita, accidente cerebrovascular isquémico y enfermedad arterial periférica.

En base a los niveles elevados de ET-1 circulante observado en estudios clínicos y experimentales con HTA inducida por ITQ, cabría pensar que un posible bloqueo del receptor de endotelina mitigaría el aumento de la presión arterial. Sin embargo, se ha visto que la administración de antagonistas del receptor ET-1, como el macitentan, puede atenuar los valores de presión arterial; mientras que el tratamiento con el antagonista bosartán no conduce a una mejora en los valores de presión arterial <sup>25,27</sup>.

Además de la posible implicación del sistema de ET-1, existen muchas teorías sobre el desarrollo y progresión de la HTA durante la terapia con ITQ, incluyendo la inhibición o falta de estimulación de la vía del NO, presencia de estrés oxidativo, complicaciones vasculares y disfunción mitocondrial. A pesar de todo, la realidad es que los mecanismos subyacentes a la hipertensión arterial inducida por Su siguen siendo desconocidos <sup>7,95</sup>. En el presente estudio se ha diseñado un tratamiento durante tres semanas con Su en ratas, para explorar posibles mecanismos moleculares y cambios funcionales y/o morfológicos involucrados en el daño vascular inducido por este ITQ. Nuestra hipótesis de partida es que el daño vascular ocasionado tras el tratamiento con



Su se debe a un incremento del estrés oxidativo, lo cual conduce a una disfunción endotelial responsable del desarrollo de la HTA. Esto coincidiría con estudios realizados por otros autores que han descrito un desbalance oxidativo en el corazón tras el tratamiento con este fármaco <sup>23,96</sup>. El tratamiento con otros ITQ como el vatalanib o el gefitinib <sup>21</sup> también produce un desequilibrio oxidativo en órganos como el corazón o los riñones.

## **5.2. Tratamiento con sunitinib en ratas.**

### **5.2.1. Características generales del modelo experimental.**

En nuestro estudio se observó una disminución en la ganancia de peso en ratas sometidas a tratamiento con Su, en comparación con los animales no tratados. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios en los que se hace uso de agentes antitumorales ITQ <sup>97,98</sup>.

Como era de esperar, nuestro diseño experimental indujo una elevación en los valores de presión arterial sistólica y diastólica en los animales tratados con Su, una característica común descrita por otros autores tras el uso de este y de otros ITQ como el sorafenib, un inhibidor de VEGFR, o de bevacizumab, anticuerpo monoclonal contra VEGF <sup>99-101</sup>. No obstante, hay que señalar que otros ITQ como vatalanib y gefitinib, no indujeron hipertensión en ratones tratados <sup>21</sup>.

Uno de los primeros estudios realizados en pacientes tratados con Su mostró un aumento en los niveles de presión arterial una semana después del inicio del tratamiento con el fármaco <sup>102</sup>. Esto sugiere que durante la primera semana se están desarrollando los procesos que desembocan en el establecimiento de la HTA. De hecho, la HTA se considera un biomarcador para la eficacia del medicamento en el tratamiento del cáncer, como ya se ha comentado anteriormente en el apartado 1.2.2 de la sección *Introducción*. Por ello, en la práctica clínica es importante la vigilancia y el tratamiento de la HTA para prevenir la aparición de cualquiera de los eventos graves anteriormente mencionados; de hecho, los pacientes con uno o más factores de riesgo de ECV se consideran

pacientes de alto riesgo a la hora de someterse a esta terapia. Según algunos protocolos de ensayos clínicos, debe realizarse una monitorización semanal de la presión arterial con el primer ciclo de inhibidor de VEGFR y luego cada 2-3 semanas durante la duración del tratamiento, lo que de igual manera sugiere que el inicio de HTA ocurre después de recibir las primeras dosis de inhibidores de la vía de señalización de VEGF <sup>7</sup>.

Por otra parte, nuestros resultados no arrojan diferencias en la frecuencia cardíaca entre el grupo Control y el grupo tratado con Su durante 21 días. Resultados similares fueron encontrados por Blasi y cols. en ratas tras 28 días de tratamiento con Su <sup>99</sup>. Otros estudios sí mencionan un aumento <sup>23</sup> o una disminución <sup>103,104</sup> de la frecuencia cardíaca después del tratamiento con Su; unas diferencias que podrían ser atribuibles a variaciones en el abordaje experimental en cuanto a las dosis empleadas y/o a la duración de los tratamientos.

Los mecanismos hipertensivos relacionados con la terapia con Su podrían deberse a un compendio de elementos entre los que se destacan su efecto inhibitorio sobre las vías de señalización del VEGF (lo que conduce a una reducción en la densidad de microvasos), reducción de la producción de NO asociada con disfunción endotelial y aumento del estrés oxidativo <sup>23</sup>. Un desequilibrio entre las moléculas vasodilatadoras (como NO) y vasoconstrictoras (p. ej., ET-1), a favor de estas últimas, también puede causar una reducción en la biodisponibilidad de NO <sup>25</sup>. Además, estudios previos indican que polimorfismos de genes como VEGFA, VEGFR-2, ET-1 y eNOS podrían predisponer al desarrollo de hipertensión tras el tratamiento con Su <sup>105</sup>.

### **5.2.2. Efecto del sunitinib sobre la función vascular. Modificación estructural de la aorta.**

Una vez conocidos los efectos del tratamiento con Su sobre las características generales de nuestro modelo animal, nos centramos en el estudio funcional y estructural de la aorta torácica, uno de los vasos afectados en el transcurso de la HTA <sup>106</sup>.

A nivel funcional, nuestros estudios de reactividad vascular demostraron una reducción en la vasodilatación dependiente de endotelio en animales tratados en comparación con los animales controles, una alteración que fue abolida después de la adición del inhibidor de NOX1, ML171. Este resultado sugiere una importante contribución de la isoforma NOX1 en la disfunción endotelial inducida por Su. La inhibición de la producción de NO, mediante la adición de L-NAME (inhibidor de la eNOS), provocó una respuesta similar en los dos grupos experimentales que, como era de esperar, respondieron en menor medida a la ACh. Por otro lado, no se observaron cambios cuando se estudió la vasorrelajación independiente del endotelio con NPS. Resultados similares han sido observados en otros estudios llevados a cabo en arterias mesentéricas de ratas tratadas con Su, y en arterias mesentéricas de ratones incubadas con vatalanib<sup>21,98</sup>. Sin embargo, en este tipo de arterias no se observaron cambios en la respuesta vascular a la ACh tras la incubación con el inhibidor de EGFR, gefitinib<sup>21</sup>.

En concordancia con nuestros resultados, Thijs y cols.<sup>98</sup> encontraron que las diferencias observadas en la respuesta inducida por la ACh entre el control y los animales tratados con Su, se eliminaron en presencia de L-NAME. Esto indica que una reducción en la biodisponibilidad de NO en ratas tratadas con Su podría ser en parte responsable de la elevada presión arterial observada en estos animales. Sin embargo, en el grupo Su, la preincubación de los anillos con L-NAME ocasionó una ligera disminución adicional de la vasodilatación inducida por la ACh, en comparación con la respuesta observada en el mismo grupo en ausencia de L-NAME; esto indicaría que, además del NO, otros factores también podrían estar desempeñando un papel en la génesis y mantenimiento de la hipertensión en el contexto del tratamiento con Su. Entre estos otros factores, como ya se ha mencionado, se incluyen el estrés oxidativo, la ET-1 y los polimorfismos genéticos<sup>21,105</sup>. Además, el hecho de que ambos grupos presenten similar vasorrelajación directa no mediada por endotelio (es decir, aportando NO exógeno al baño de órganos), indica que el efecto de Su sobre la función vascular es atribuible a defectos en la función endotelial.

Cabe destacar que estudios llevados a cabo por Thijs y cols.<sup>98</sup>, en pacientes de CCRM tratados con Su, descartaron la presencia de disfunción endotelial antes de la aparición de HTA, lo cual sugiere que la disfunción endotelial no precede al desarrollo de HTA inducida por el fármaco en humanos.

En vista del deterioro en la función vascular de la aorta, procedimos a realizar un estudio morfológico de la misma en busca de posibles alteraciones atribuibles al tratamiento con Su. El análisis estructural de la pared aórtica mostró modificaciones significativas tras el tratamiento con Su, incluyendo aumentos del grosor de la túnica media, del área transversal de la misma, y de la ratio media/lumen (si bien el área del lumen *per se* permaneció inalterada). En base a la clasificación descrita por Renna y cols., estos resultados en su conjunto indican que se produce una remodelación vascular hipertrófica severa tras el tratamiento con Su. Cabe destacar que este tipo de remodelado es característico de las arterias grandes en el envejecimiento o en la HTA<sup>58</sup>.

Nuestros resultados del análisis histomorfométrico concuerdan con estudios previos en arterias mesentéricas de ratones tratados con vatalanib, en los que se exhibió una ratio media/lumen aumentada, sugiriendo un proceso de remodelación vascular<sup>21</sup>. Sin embargo, la remodelación vascular en dicho estudio no estuvo asociada a la elevación de la presión arterial, ya que este fármaco no produjo HTA. Por otro lado, el uso de gefitinib en el mismo estudio no tuvo efecto sobre el área de la sección transversal de la túnica media<sup>21</sup>. Además, también se han observado reducciones en el diámetro de arterias mesentérica de ratones<sup>98</sup> y de rata<sup>27</sup>, junto con rigidez y fibrosis en las grandes arterias humanas<sup>107</sup>, después del tratamiento con Su y con otros inhibidores de VEGF.

Los procesos de remodelación de la pared vascular implican cambios en el crecimiento y migración de CMLV, disfunción endotelial, procesos inflamatorios y cambios en los componentes de la MEC<sup>58</sup>. En este sentido, el 60% del colágeno de la vasculatura es de tipo I y el 30% es de tipo III. El colágeno tipo I se encuentra en la MEC

de las tres capas que constituyen la pared aórtica <sup>54</sup>, siendo más abundante en las tunicas íntima y adventicia<sup>108</sup>; por otro lado, el colágeno III se encuentra en mayor proporción en la túnica media<sup>109</sup>. De esta manera, junto con un marcaje positivo para la inmunofluorescencia de Col1 $\alpha$ 1 en la túnica adventicia y túnica media de las aortas de ambos grupos de animales, se observó un intenso marcaje de Col1 $\alpha$ 1 en las tunicas media e íntima en los animales tratados con Su, en comparación con las ratas control. Esta diferencia en la cantidad de Col1 $\alpha$ 1 podría deberse a cambios en la ubicación del colágeno como consecuencia del tratamiento con Su, ya que otras enfermedades de la aorta parecen cursar con modificaciones en la cantidad y ubicación de las fibras de colágeno <sup>110</sup>. En nuestro estudio, la deposición de colágeno tipo I se observó también en la MB del endotelio de aortas tratadas con Su, cosa que no ocurrió en el grupo Control.

Estas fibras de colágeno tipo I pueden interponerse entre las células endoteliales y la túnica media, causando un aumento en el grosor de la aorta. Curiosamente, en un estudio con células de adenocarcinoma de pulmón humano, se ha visto que en estas células se induce resistencia a gefitinib en presencia de colágeno de tipo I, indicando que este colágeno actuaría aumentando la resistencia a la terapia molecular dirigida además de actuar como una barrera fisiológica para la distribución del fármaco<sup>111</sup>. Ello induce a pensar que el Col1 en la túnica íntima puede estar actuando de igual manera en nuestro caso. El intenso marcaje positivo para Col1 $\alpha$ 1 observado en ratas sometidas al tratamiento con Su, está respaldado por el incremento en el contenido total de colágeno y por la regulación positiva de la citoquina profibrótica TGF- $\beta$ 1 y el colágeno tipo I, lo que sugiere un vínculo entre la remodelación vascular / fibras de colágeno / TGF-  $\beta$ 1 en estos animales; asimismo, el tratamiento con el ITQ altera claramente el patrón de expresión de las enzimas involucradas en el recambio de colágeno, existiendo una disminución de la expresión génica de la metaloproteinasa de matriz MMP9, y un aumento del inhibidor tisular de metaloproteinasas TIMP1. Estudios previos en nuestro

laboratorio mostraron resultados similares de expresión de MMP9 y TIMP1 en el corazón de ratas tratadas con Su <sup>23</sup>.

### **5.2.3. Desbalance oxidativo tras el tratamiento con sunitinib**

Como se informó anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los mecanismos involucrados en la síntesis de MEC y acumulación de fibras de colágeno en la capa íntima durante el proceso de remodelación vascular <sup>63,112</sup>, donde se observa un aumento de las especies prooxidantes junto con una reducción en la producción de NO endotelial <sup>113</sup>. En nuestro estudio sobre la producción de anión superóxido sobre secciones de aorta, estimada mediante tinción con DHE, encontramos un aumento en el contenido de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en las aortas de ratas tratadas con Su en comparación con el grupo Control. El uso de inhibidores de isoformas de NOX resultó en una clara reducción de la producción de anión superóxido en las ratas tratadas. Además, cuando se determinó la actividad de NADPH oxidasa mediante quimioluminiscencia, se observó igualmente un aumento de este parámetro en las aortas de ratas tratadas con Su en comparación con el grupo de Control, que también fue bloqueado por inhibición específica de las isoformas NOX. Por el contrario, el L-NAME (inhibidor de eNOS) no afecta la liberación de superóxido en el grupo tratado con Su. En su conjunto, estos resultados apuntan a NOX1 como la principal isoforma involucrada en la producción de ERO en la aorta de animales tratados con Su, lo que apoya nuestros hallazgos relativos a la vasodilatación dependiente de endotelio. Todos estos resultados vislumbran la posible implicación del estrés oxidativo en la producción del daño vascular mostrado anteriormente.

Tal como se comentó en el apartado 1.3.1. de la sección *Introducción*, se sabe que la producción de anión superóxido en el proceso de HTA está íntimamente ligada a la enzima NADPH oxidasa. Las NOXes se expresan en diferentes compartimentos subcelulares, especialmente en el retículo endoplasmático (RE) y el núcleo; se trata de un proceso altamente regulado, ya que no todos los orgánulos en los que se generan

ERO poseen NOXes, como por ejemplo las mitocondrias <sup>114</sup>. En concordancia con los resultados que acabamos de describir, observamos un marcaje positivo de NOX1 en el interior de CMLV y en la túnica adventicia en las aortas extraídas de ambos grupos experimentales, siendo el marcaje NOX1 positivo mucho más notable en el grupo Su. Se ha observado que en CMLV de ratas hipertensas, las isoformas NOX1 y NOX4 se localizan principalmente en la membrana plasmática y el RE, respectivamente, y son responsables del aumento de la generación basal de ERO <sup>114</sup>.

La expresión de NOX1 en las células endoteliales es extremadamente baja <sup>115</sup>, lo que explica que en las aortas controles no hayamos observado expresión de NOX1 a este nivel. Sin embargo, sí se observó un intenso marcaje positivo NOX1 en el interior de las células endoteliales en aortas de ratas tratadas con Su. Este hecho supone una condición patológica del endotelio, y está en consonancia con observaciones previas en humanos que sugieren que la sobreexpresión de NOX1, NOX2 y NOX5 promueve disfunción endotelial, inflamación, y apoptosis dentro de la pared del vaso <sup>41</sup>.

En nuestro estudio también se observaron cambios en la expresión de las isoformas de la NADPH oxidasa. Específicamente, se aprecia una regulación al alza de la expresión génica de NOX1, NOX2 y NOX4 en ratas tratadas con Su. A nivel proteico, solo NOX1 y NOX2 mostraron sobreexpresión, mientras que NOX4, curiosamente, no mostró cambios en comparación con los animales no tratados. Estudios anteriores demostraron que el tratamiento con vatalanib indujo una activación de la NADPH oxidasa en células endoteliales aórticas humanas (HAEC) y en riñón de ratón, mientras que no se encontraron cambios después del tratamiento con gefitinib <sup>21</sup>. Estos autores también encontraron modificaciones en la regulación de las NOXes después del tratamiento con los mismos ITQ; así, se encontró un aumento en la expresión de ARNm de NOX1 en corazón, junto con una disminución en la expresión de NOX4 en riñón, en ratones tratados con vatalanib o gefitinib, sin alteración en los niveles de NOX2 en ambos tejidos <sup>21</sup>. Cuando se llevaron a cabo estudios *in vitro* en CMLV y HAEC, se observaron diferencias dependiendo de las isoformas de NOX y del tipo de ITQ añadido

al medio de incubación<sup>21</sup>. Estudios recientes en nuestro laboratorio también han puesto de manifiesto un aumento en la expresión de NOXes en el corazón de ratas tratadas con Su<sup>23</sup>. Todos estos hallazgos sugieren efectos diferenciales de los ITQ en el sistema NADPH oxidasa; sin embargo, a pesar de las diferencias específicas observadas en la expresión de isoformas de NOX, el desequilibrio oxidativo está altamente involucrado en la hipertensión arterial y en la toxicidad producida por Su y otros ITQ, incluidos los inhibidores de VEGFR y EFGR.

En nuestro estudio, este desequilibrio en el sistema redox se vio respaldado por las alteraciones observadas en el sistema de defensa antioxidante. Así, obtuvimos un incremento en la expresión génica y proteica de SOD y GPx en las ratas tratadas. Sin embargo, en el caso de la GR, su expresión génica y proteica disminuyó con el tratamiento, llegando a alcanzar un 50% con respecto al control en el último caso. En cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno, se observó una disminución significativa en homogenizados procedentes de aortas de ratas tratadas con Su; este resultado podría deberse al aumento en la expresión génica y proteica de la GPx en las ratas tratadas con Su, enzima que junto a la catalasa son las responsables de la eliminación del agua oxigenada. Neves y cols.<sup>21</sup> observaron una disminución en la expresión génica cardíaca de las enzimas antioxidantes catalasa y GPx en ratones tratados con vatalanib, sin efecto sobre SOD<sup>21</sup>; estos resultados fueron similares en células HAEC tratadas con el mismo ITQ. Curiosamente, ese mismo estudio no mostró modificaciones a nivel génico de estas enzimas antioxidantes tras el tratamiento con gefitinib en HAEC. Es necesario señalar en este punto que, para el completo análisis y discusión de los resultados obtenidos en nuestro estudio con relación al sistema antioxidante, estos deberían ser valorados junto con la correspondiente medida de la actividad de las enzimas implicadas.

Como mencionamos en apartados anteriores, existe consenso respecto de la implicación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y Nrf2 en los procesos de inflamación y estrés oxidativo; así, la activación de NF- $\kappa$ B promueve la expresión de enzimas



proinflamatorias, y la elevación de ERO provoca un aumento en la expresión génica de NF- $\kappa$ B. El claro aumento en la expresión génica del factor de transcripción NF- $\kappa$ B observado en el presente estudio indica un posible incremento en la respuesta inflamatoria secundario al tratamiento con Su. También hemos detectado un aumento en la expresión del factor regulador del sistema de defensa antioxidante, Nrf2. Sin embargo, se ha visto que en animales con hipertensión inducida, este sistema no llega a ser suficiente para contrarrestar los efectos que genera el estrés oxidativo, al existir niveles elevados de represores de Nrf2<sup>47</sup>. Por ello, estudios sucesivos deberían profundizar en el análisis del estado inflamatorio bajo nuestras condiciones experimentales, así como determinar los represores de Nrf2 (Keap1) y el estado de activación de NF- $\kappa$ B mediante I $\kappa$ B.

Como se ha explicado anteriormente, la deficiencia en BH<sub>4</sub> se debe a la oxidación de esta molécula por ERO como el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), siendo esta deficiencia uno de los mecanismos que ocasiona el desacople de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para contribuir al desarrollo de estrés oxidativo vascular en la HTA mediante la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup><sup>44</sup>. En nuestro estudio se demuestra que existe un aumento en el grado de nitrosilación de proteínas en la aorta de animales tratados con Su, indicando la presencia de estrés nitrooxidativo, y por tanto acumulación de anión peroxinitrito, a nivel de este tejido.

Aunque la biodisponibilidad de NO disminuye claramente con el desacople de la eNOS, también puede ocurrir con el bloqueo de VEGFR. En condiciones normales, la unión de VEGF a VEGFR-2 en células endoteliales produce NO. Por lo tanto, el efecto inmediato de la inhibición de VEGFR es una disminución en la actividad de la eNOS, debido a una reducción en la actividad de PI3K/Akt y posteriormente a través de una disminución en la expresión de eNOS. Además, otra consecuencia de la inhibición de VEGFR es el desacople de la eNOS, lo que lleva a una producción paradójica de aniones superóxido<sup>11,18</sup>. Los ITQ evitan la cascada de fosforilación y, por lo tanto, la formación de NO, lo que lleva a un aumento de la presión arterial<sup>116</sup>.

Curiosamente, los resultados presentados en este estudio muestran una regulación génica al alza de la eNOS. A pesar de ello, se observó una disminución de la expresión y activación de esta proteína y una reducción en la producción de NO, donde el uso de inhibidores de NOX aumentó la biodisponibilidad de NO incluso por encima de los valores medidos en el grupo control. Otro ITQ, como es el vatalanib, se ha visto que también disminuye la activación de la vía eNOS-NO, junto con un aumento en la producción de ERO en CMLV y la formación de ONOO<sup>-</sup> <sup>21</sup>. En el caso del lenvatinib, se vislumbra igualmente que la hipertensión inducida por el fármaco pueda ser causada por una disminución en la producción de NO, como resultado de la inhibición de VEGF y del deterioro de la función endotelial vascular <sup>117</sup>.

#### **5.2.4. Alteración de la función vascular tras el uso de vesículas extracelulares de animales tratados con sunitinib.**

En la actualidad, muchas líneas de investigación se están centrando en el estudio de las vesículas extracelulares (VE), debido a la importancia que tienen en el desarrollo de patologías muy diversas, incluyendo el desarrollo de HTA. Además, se conoce que diferentes tratamientos farmacológicos modifican tanto la carga como la función que desempeñan las VE, haciéndolas interesantes para su estudio <sup>76</sup>.

En nuestro análisis de la función vascular, se observó una respuesta vasodilatadora en respuesta a la ACh significativamente menor en los anillos aórticos de ratas controles preincubados con VE circulantes procedentes de ratas tratadas con Su, al comparar con el efecto de las VE obtenidas de ratas controles. Estos resultados sugieren la mediación de las VE en el efecto nocivo del Su. Cuando se llevaron a cabo los mismos estudios, pero en presencia de N-acetilcisteína (sustancia antioxidante), se observó una recuperación plena de la capacidad vasodilatadora de los vasos, recuperándose el patrón normal observado en las muestras controles. Estos resultados sustentan lo anteriormente descrito sobre la implicación de las especies reactivas de oxígeno en el deterioro de la arteria aorta tras el tratamiento con Su, y justificarían la

necesidad de un estudio en mayor profundidad en cuanto a la caracterización y carga de estas VE.

A nuestro entender, no existen en la literatura artículos de investigación básica ni clínica sobre la función vascular mediante el uso de VE circulantes tras la terapia con ITQ. Qu y cols.<sup>118</sup> sí identificaron que un ARN largo no codificante transmitido por exosomas podría promover la resistencia a sunitinib en pacientes con cáncer renal. Recientemente, Neves y cols.<sup>119</sup> han demostrado que las VE circulantes de pacientes tratados con un inhibidor de VEGFR median la lesión de células endoteliales observadas en cultivos celulares de HAEC. En dicho trabajo se identifica a estas vesículas como posibles biomarcadores de lesiones endoteliales inducidas tras el tratamiento con inhibidores de VEGFR y, aún más interesante, se muestra tanto el papel mediador de las VE en la señalización proinflamatoria, como su implicación en la toxicidad cardiovascular asociada a pacientes tratados con inhibidores de VEGFR. Otra de las implicaciones de las VE en la patogenia de la HTA, descrita en el apartado 1.5.2. de la sección *Introducción*, muestra que exosomas plasmáticos de ratas SHR pueden provocar promover el desarrollo de HTA en ratas normotensas, además de modular la estructura y función de los tejidos cardiovasculares<sup>85</sup>.

Actualmente hay controversia entre la comunidad científica con respecto al tamaño, métodos de aislamiento y detección de VE, así como a la cantidad que debe emplearse para cada experimento, y cuáles son las especificaciones de su uso en el estudio de las diferentes patologías. En nuestro proyecto hemos empleado el método de cuantificación de cantidad total de proteína, ya que posee la ventaja de ser un método rápido y muy asequible. Sin embargo, tiene la limitación de que no refleja el contenido bioactivo ni la concentración, tamaño y distribución de las vesículas. Una solución alternativa sería realizar la caracterización de dichas VE mediante citometría de flujo; ello permitiría detectar VE de un tamaño  $\leq 150$  nm, abarcando en su mayoría las tres poblaciones de vesículas descritas en el apartado 1.5.1. de la sección *Introducción*<sup>120</sup>.

En el presente estudio hemos obtenido las VE a partir del plasma de animales tratados. Existen otras alternativas que no implican el uso de animales, como el uso de cultivos celulares estimulados con ITQ o de VE procedentes de pacientes sometidos a tratamiento con algún ITQ. Otros autores proponen una posible estrategia para la producción de VE (concretamente exosomas) en donde el cultivo celular se realice en un tipo determinado de biorreactor, lo que permitiría un mayor rendimiento <sup>121</sup>.

La dualidad que supone la eficacia de los tratamientos con ITQ sobre diferentes procesos neoplásicos, frente al desarrollo de múltiples efectos adversos derivados de dichos tratamientos, justifica la necesidad actual de ofrecer una “medicina personalizada”. Esto ha llevado a la comunidad científica a la búsqueda de biomarcadores que sean lo suficientemente fiables para realizar un buen diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la enfermedad, con el desafío que supone que estos biomarcadores tengan validación clínica. Por ejemplo, en pacientes con carcinoma metastásico de riñón se han empleado como marcadores diversas proteínas circulantes (sobre muestras de plasma u orina), ARN libre de células tumorales y micro-ARN; sin embargo, hasta el momento no se han alcanzado la preceptiva validación clínica <sup>18</sup>. Con este estudio piloto preliminar mediante el uso de VE procedentes de animales tratados con Su, hemos querido generar un antecedente que abra camino para el futuro abordaje del estudio de las VE como biomarcadores, y como elemento implicado en la patogénesis y fisiopatología de los efectos adversos más relevantes asociados al uso de ITQ.

## **6. CONCLUSIONES/*CONCLUSIONS***



1. El tratamiento con sunitinib (Su) provoca una disminución de la ganancia de peso, junto con un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica, sin observarse cambios en la frecuencia cardíaca.
2. Se ha observado una alteración de la función vascular en la aorta torácica de ratas tratadas con Su, con una reducción en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio. Además, se pone en evidencia la implicación de las VE en el desarrollo de la HTA asociado al tratamiento de Su.
3. El tratamiento con Su produce un remodelado en la aorta torácica, observándose un aumento en el grosor de la pared vascular, principalmente de la túnica media.
4. La administración de Su desencadena un proceso fibrótico consistente en un aumento en la deposición de fibras de colágeno a lo largo de la pared vascular, específicamente del colágeno tipo 1 (Col1 $\alpha$ 1) en la túnica media e íntima, acompañado de un aumento de TGF- $\beta$  y de un desequilibrio en las proteínas MMP9 y TIMP1.
5. El Su conduce a una alteración en el estado oxidativo vascular, aumentando la actividad de la enzima NADPH oxidasa y la producción de ERO (anión superóxido), donde están involucradas las isoformas NOX1, NOX2 y NOX4; la isoforma NOX1 parece la más implicada en este aumento, observándose un intenso marcaje de esta isoforma en el endotelio vascular de animales tratados con Su.
6. Se observa un desequilibrio en la expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes (SOD, GR y GPx) en la aorta de ratas tratadas con Su. El fármaco también induce un aumento de la nitrosilación de proteínas y altera la funcionalidad de la eNOS, lo que se traduce en una reducción en los niveles de NO. Además, la expresión génica de factores de transcripción implicados en los procesos de estrés oxidativo, como son el Nrf2 y NF- $\kappa$ B, se ve incrementada en la aorta de ratas tratadas con Su





1. Sunitinib (Su) treatment impairs weight gain and increases systolic and diastolic blood pressure without altering heart rate.
2. Su-treated rats showed alteration of vascular function with decreased endothelium-dependent vasodilator response. Furthermore, our study evidences the involvement of extracellular vesicles in the development of arterial hypertension secondary to treatment with Su.
3. Su treatment induces remodeling of thoracic aorta with increased vascular wall thickness, mainly at the *tunica media* level.
4. Chronic administration of Su triggers a fibrotic process with increased deposition of type 1 collagen (Col1 $\alpha$ 1) along the vascular wall (specifically in the inner and middle layers). This is accompanied by an increase in TGF- $\beta$  expression and by an imbalance between MMP9 and TIMP1 proteins.
5. Treatment with Su leads to an oxidative imbalance in the vasculature, increasing the activity of NADPH oxidase enzyme with subsequent superoxide overproduction. This was paralleled by upregulation of NOX1, NOX2 and NOX4 isoforms, with an apparent major involvement of the former in Su-induced oxidative stress.
6. Aortas of rats treated with Su presented with disturbed gene and protein expression of antioxidant enzymes (SOD, GR and GPx). The drug also favored protein nitrosylation while weakening eNOS function, thus leading to a reduction of NO bioavailability. Furthermore, transcription factors involved in the regulation of oxidative stress processes, such as Nrf2 and NF- $\kappa$ B, were upregulated following treatment with Su.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):117-123.
2. Ségaliny AI, Tellez-Gabriel M, Heymann M-F, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. *J Bone Oncol.* 2015;4(1):1-12.
3. Touyz RM, Herrmann J. Cardiotoxicity with vascular endothelial growth factor inhibitor therapy. *NPJ Precis Oncol.* 2018;2(1):13.
4. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology (WHOC). Proposed new classification for L01XE Protein kinase inhibitors and L01XX Other antineoplastic agents. [www.whocc.no](http://www.whocc.no).
5. Faivre S, Niccoli P, Castellano D, et al. Sunitinib in pancreatic neuroendocrine tumors: updated progression-free survival and final overall survival from a phase III randomized study. *Ann Oncol.* 2017;28(2):339-343.
6. Manir K, Banerjee D, Bhowmick R, Roy C. Sunitinib-induced acute severe hypothyroidism in a case of metastatic gastrointestinal stromal tumor: A case report. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(10):818.
7. Agarwal M, Thareja N, Benjamin M, Akhondi A, Mitchell GD. Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Hypertension. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(8):65.
8. Robinson E, Khankin E, Karumanchi SA, Humphreys B. Hypertension Induced by VEGF Signaling Pathway Inhibition: Mechanisms and Potential Use as a Biomarker. *Semin Nephrol.* 2011;30(6):591-601.
9. Belcik JT, Qi Y, Kaufmann BA, et al. Cardiovascular and systemic microvascular effects of anti-vascular endothelial growth factor therapy for cancer. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(7):618-625.
10. León-Mateos L, Mosquera J, Antón Aparicio L. Treatment of sunitinib-induced hypertension in solid tumor by nitric oxide donors. *Redox Biol.* 2015;6:421-425.
11. Herrmann J. Tyrosine Kinase Inhibitors and Vascular Toxicity: Impetus for a Classification System? *Curr Oncol Rep.* 2016;18(6):33.
12. Caldemeyer L, Dugan M, Edwards J, Akard L. Long-Term Side Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malign Rep.* 2016;11(2):71-79.
13. Schmid TA, Gore ME. Sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Ther Adv Urol.* 2016;8(6):348-371.
14. Gorini S, De Angelis A, Berrino L, Malara N, Rosano G, Ferraro E. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:1-15.
15. Fu Y, Wei X, Lin L, Xu W, Liang J. Adverse reactions of sorafenib, sunitinib, and imatinib in treating digestive system tumors. *Thorac Cancer.* 2018;9(5):542-547.
16. Donskov F, Michaelson MD, Puzanov I, et al. Sunitinib-associated hypertension and neutropenia as efficacy biomarkers in metastatic renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer.* 2015;113(11):1571-1580.
17. Goldstein D, Rosenberg JE, Figlin RA, et al. Is change in blood pressure a biomarker of pazopanib and sunitinib efficacy in advanced/metastatic renal cell carcinoma? *Eur J Cancer.* 2016;53:96-104.
18. Møller NB, Budolfson C, Grimm D, et al. Drug-Induced Hypertension Caused by Multikinase Inhibitors (Sorafenib, Sunitinib, Lenvatinib and Axitinib) in Renal Cell Carcinoma Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19).
19. Izzedine H, Derosa L, Le Teuff G, Albiges L, Escudier B. Hypertension and angiotensin system inhibitors: Impact on outcome in sunitinib-treated patients for metastatic renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2015;26(6):1128-1133.
20. Robinson ES, Khankin E V, Choueiri TK, et al. Suppression of the Nitric Oxide Pathway in. 2010;56(6):1131-1136.
21. Neves KB, Rios FJ, Van Der Mey L, et al. VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) inhibition induces cardiovascular damage via redox-sensitive processes. *Hypertension.* 2018;71(4):638-647.

22. El-Remessy AB, Bartoli M, Platt DH, Fulton D, Caldwell RB. Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *J Cell Sci.* 2005;118(1):243-252.
23. Blanca AJ, Ruiz-Armenta M V., Zambrano S, et al. Inflammatory and fibrotic processes are involved in the cardiotoxic effect of sunitinib: Protective role of l-carnitine. *Toxicol Lett.* 2016;241:9-18.
24. Sridharan V, Thomas CJ, Cao M, et al. Effects of local irradiation combined with sunitinib on early remodeling, mitochondria, and oxidative stress in the rat heart. *Radiother Oncol.* 2016;119(2):259-264.
25. Kappers MHW, van Esch JHM, Sluiter W, Sleijfer S, Danser AHJ, van den Meiracker AH. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension.* 2010;56(4):675-681.
26. Lankhorst S, Kappers MHW, Van Esch JHM, et al. Treatment of hypertension and renal injury induced by the angiogenesis inhibitor sunitinib preclinical study. *Hypertension.* 2014;64(6):1282-1289.
27. Carter JJ, Fretwell L V., Woolard J. Effects of 4 multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors on regional hemodynamics in conscious, freely moving rats. *FASEB J.* 2017;31(3):1193-1203.
28. Suomalainen A, Battersby BJ. Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(2):77-92.
29. Nordgren M, Fransen M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie.* 2014;98:56-62.
30. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(11):42.
31. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046.
32. Banerjee J, Ghose J, Sinha M, Sen S. Redox Control of Vascular Biology. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:3764252.
33. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19.
34. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol.* 2018;14:618-625.
35. García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, Salices M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacol Res.* 2016;114:110-120.
36. Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(3):170-194.
37. Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in poly-morphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.* 1964;20(1):21-23.
38. Montezano AC, Tsiropoulou S, Dulak-Lis M, Harvey A, Camargo LDL, Touyz RM. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(5):425-433.
39. Buvelot H, Jaquet V, Krause K-H. Mammalian NADPH Oxidases. *Methods Mol Biol.* 2019;1982:17-36.
40. Manea A, Manea SA, Gafencu A V, Raicu M, Simionescu M. AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(5):878-885.
41. Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond E, Cahill P. Nox, Reactive Oxygen

- Species and Regulation of Vascular Cell Fate. *Antioxidants*. 2017;6(4):90.
42. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-1923.
  43. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(1):164-182.
  44. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2017;120(4):713-735.
  45. Caravaca AS, Centa M, Gallina AL, Tarnawski L, Olofsson PS. Neural reflex control of vascular inflammation. *Bioelectron Med*. 2020;6(1):3.
  46. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev*. 2018;98(3):1169-1203.
  47. Lopes RA, Neves KB, Tostes RC, Montezano AC, Touyz RM. Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension. *Hypertension*. 2015;66(6):1240-1250.
  48. Fiordelisi A, Iaccarino G, Morisco C, Coscioni E, Sorriento D. NFkappaB is a Key Player in the Crosstalk between Inflammation and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1599.
  49. Jiao L, Jiang M, Liu J, Wei L, Wu M. Nuclear factor-kappa B activation inhibits proliferation and promotes apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Vascular*. 2018;26(6):634-640.
  50. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):68-78.
  51. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.
  52. Wang Z-Y, Liu Y-Y, Liu G-H, Lu H-B, Mao C-Y. I-Carnitine and heart disease. *Life Sci*. 2018;194:88-97.
  53. Leloup AJA, Van Hove CE, Heykers A, Schrijvers DM, De Meyer GRY, Franssen P. Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca(2+)-Channels. *Front Physiol*. 2015;6:375.
  54. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2016;14(3):438-448.
  55. Witter K, Tonar Z, Schöpfer H. How many Layers has the Adventitia? - Structure of the Arterial Tunica Externa Revisited. *Anat Histol Embryol*. 2017;46(2):110-120.
  56. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2012;110(10):1364-1390.
  57. Schröder K. NADPH Oxidases in Redox Regulation of Cell Adhesion and Migration. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(13):2043-2058.
  58. Renna NF, de las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. *Int J Hypertens*. 2013;2013:1-7.
  59. Rizzoni D, Porteri E, Boari GEM, et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation*. 2003;108(18):2230-2235.
  60. Bruno RM, Grassi G, Seravalle G, Savoia C, Rizzoni D, Virdis A. Age- and Sex-Specific Reference Values for Media/Lumen Ratio in Small Arteries and Relationship With Risk Factors. *Hypertension*. 2018;71(6):1193-1200.
  61. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2015;116(3):531-549.
  62. Karimi Galoughi K, Ashley EA, Ali ZA. Redox regulation of vascular remodeling. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(2):349-363.

63. Zhang M-J, Zhou Y, Chen L, et al. An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(2):119-130.
64. Althoff TF, Offermanns S. G-protein-mediated signaling in vascular smooth muscle cells — implications for vascular disease. *J Mol Med.* 2015;93(9):973-981.
65. Baeyens N, Schwartz MA. Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Mol Biol Cell.* 2016;27(1):7-11.
66. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):549-574.
67. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* 2015;373(1):95-96.
68. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol.*
69. Lan T-H, Huang X-Q, Tan H-M. Vascular fibrosis in atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(5):401-407.
70. Blascke de Mello MM, Parente JM, Schulz R, Castro MM. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2019;116:36-44.
71. Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, Rios F, Touyz RM. Vascular Fibrosis in Aging and Hypertension: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Can J Cardiol.* 2016;32(5):659-668.
72. Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. *Cell Signal.* 2018;52:112-120.
73. Nolte M, Margadant C. Controlling Immunity and Inflammation through Integrin-Dependent Regulation of TGF- $\beta$ . *Trends Cell Biol.* 2020;30(1):49-59.
74. Serralheiro P, Soares A, Costa Almeida C, Verde I. TGF- $\beta$ 1 in Vascular Wall Pathology: Unraveling Chronic Venous Insufficiency Pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2534.
75. Sturrock A, Cahill B, Norman K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(4):L661-L673.
76. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. Extracellular Vesicles: Mechanisms in Human Health and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(6):813-856.
77. van Dommelen SM, Vader P, Lakhal S, et al. Microvesicles and exosomes: Opportunities for cell-derived membrane vesicles in drug delivery. *J Control Release.* 2012;161(2):635-644.
78. Hauser P, Wang S, Didenko V V. Apoptotic Bodies: Selective Detection in Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol.* 2017;1554:193-200.
79. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43-51.
80. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(8):E968-E977.
81. Juan T, Fürthauer M. Le complexe ESCRT: Du transport endosomal au développement d'organismes multicellulaires. *Biol Aujourd'hui.* 2015;209(1):111-124.
82. Haraszti RA, Didiot M-C, Sapp E, et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J Extracell vesicles.* 2016;5:32570.
83. Deng W, Tang T, Hou Y, et al. Extracellular vesicles in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2019;495:109-117.
84. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles



- in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost.* 2009;101(03):439-451.
85. Otani K, Yokoya M, Kodama T, et al. Plasma exosomes regulate systemic blood pressure in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(2):776-783.
  86. Aliotta JM, Pereira M, Wen S, et al. Exosomes induce and reverse monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. *Cardiovasc Res.* 2016;110(3):319-330.
  87. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, et al. Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011;18(6):775-789.
  88. Gkaliagkousi E, Gavriilaki E, Vasileiadis I, et al. Endothelial Microvesicles Circulating in Peripheral and Coronary Circulation Are Associated With Central Blood Pressure in Coronary Artery Disease. *Am J Hypertens.* 2019;32(12):1199-1205.
  89. Sansone R, Baaken M, Horn P, et al. Release of endothelial microparticles in patients with arterial hypertension, hypertensive emergencies and catheter-related injury. *Atherosclerosis.* 2018;273:67-74.
  90. Vila-Liante V, Sánchez-López V, Martínez-Sales V, et al. Impact of sample processing on the measurement of circulating microparticles: storage and centrifugation parameters. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(11).
  91. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
  92. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft.* 1879;12(1):426-428.
  93. Touyz RM, Herrmann J. Cardiotoxicity with vascular endothelial growth factor inhibitor therapy. *npj Precis Oncol.* 2018;2(1):13.
  94. Jiao Q, Bi L, Ren Y, Song S, Wang Q, Wang Y shan. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer.* 2018;17(1):1-12.
  95. León-Mateos L, Mosquera J, Antón Aparicio L. Treatment of sunitinib-induced hypertension in solid tumor by nitric oxide donors. *Redox Biol.* 2015;6:421-425.
  96. Sridharan V, Thomas CJ, Cao M, et al. Effects of local irradiation combined with sunitinib on early remodeling, mitochondria, and oxidative stress in the rat heart. *Radiother Oncol.* 2016;119(2):259-264.
  97. Goodman VL, Rock EP, Dagher R, et al. Approval Summary: Sunitinib for the Treatment of Imatinib Refractory or Intolerant Gastrointestinal Stromal Tumors and Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(5):1367-1373.
  98. Thijs AMJ, Van Herpen CML, Verweij V, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation does not initiate the development of sunitinib-associated hypertension. *J Hypertens.* 2015;33(10):2075-2082.
  99. Blasi E, Heyen J, Patyna S, et al. Sunitinib, a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Increases Blood Pressure in Rats without Associated Changes in Cardiac Structure and Function. *Cardiovasc Ther.* 2012;30(5):287-294.
  100. Kojonazarov B, Sydykov A, Pullamsetti SS, et al. Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling. *Int J Cardiol.* 2013;167(6):2630-2637.
  101. 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.
  102. Azizi M, Chedid A, Oudard S. Home Blood-Pressure Monitoring in Patients Receiving Sunitinib. *N Engl J Med.* 2008;358(1):95-97.
  103. Henderson KA, Borders RB, Ross JB, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors

- on rat isolated heart function and protein biomarkers indicative of toxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(1):150-159.
104. Sandhu H, Cooper S, Hussain A, Mee C, Maddock H. Attenuation of Sunitinib-induced cardiotoxicity through the A3 adenosine receptor activation. *Eur J Pharmacol*. 2017;814:95-105.
  105. Eechoute K, Van Der Veldt AAM, Oosting S, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and vascular endothelial growth factor (VEGF) predict sunitinib-induced hypertension. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):503-510.
  106. Brown IAM, Diederich L, Good ME, et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(9):1969-1985.
  107. Alivon M, Giroux J, Briet M, Goldwasser F, Laurent S, Boutouyrie P. Large artery stiffness and hypertension after antiangiogenic drugs: Influence on cancer progression. *J Hypertens*. 2015;33(6):1310-1317.
  108. Lakatta EG. The reality of aging viewed from the arterial wall. *Blood Press Arter Wall Mech Cardiovasc Dis*. 2014;9781447151(2):137-153.
  109. Coen M, Gabbiani G, Bochaton-Piallat M-L. Myofibroblast-Mediated Adventitial Remodeling. Chen YE, ed. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2391-2396.
  110. 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).
  111. Yamazaki S, Higuchi Y, Ishibashi M, et al. Collagen type I induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated cancer cells by mTOR activation through Akt-independent pathway. *Cancer Sci*. 2018;109(6):2063-2073.
  112. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.
  113. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y, Ali F. Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors. *Inflammopharmacology*. 2016;24(1):1-10.
  114. Camargo L, Harvey A, Rios F, et al. Vascular Nox compartmentalization, protein hyperoxidation and ER stress response in hypertension. *Hypertension*. 2018;72(1):235-246.
  115. Hahner F, Moll F, Schröder K. NADPH oxidases in the differentiation of endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2020;116(2):262-268.
  116. Ancker O, Wehland M, Bauer J, Infanger M, Grimm D. The Adverse Effect of Hypertension in the Treatment of Thyroid Cancer with Multi-Kinase Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):625.
  117. Sueta D, Suyama K, Sueta A, et al. Lenvatinib, an oral multi-kinases inhibitor, - associated hypertension: Potential role of vascular endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 2017;260:116-120.
  118. Qu L, Ding J, Chen C, et al. Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA. *Cancer Cell*. 2016;29(5):653-668.
  119. Neves KB, Rios FJ, Jones R, Evans TRJ, Montezano AC, Touyz RM. Microparticles from vascular endothelial growth factor pathway inhibitor-treated cancer patients mediate endothelial cell injury. *Cardiovasc Res*. 2019;115(5):978-988.
  120. Willis GR, Kourembanas S, Mitsialis SA. Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:63.
  121. Chen Y, Lin E, Chiou T, Horng-Jyh H. Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice. *Tzu Chi Med J*. 2020;32(2):113-120.

