

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.



Programa de Doctorado en Fisiología.

Tesis Doctoral.

**Efectos del Sorafenib, un inhibidor tirosina
quinasa, en el control del tono vascular.**

Isabel Pérez Monzó.

DIRECTORES:

Dr. Pascual Medina Bessó.

Dra. Gloria Segarra Irles.

Dra. Paloma Lluch García.

Valencia, 2018.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA.



Programa de Doctorado en Fisiología.

Tesis Doctoral.

**Efectos del Sorafenib, un inhibidor tirosina
quinasa, en el control del tono vascular.**

Valencia, 2018.



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA.

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA.

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA.

Dr. Pascual Medina Bessó, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universitat de València, Dra. Gloria Segarra Irlés, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universitat de València y Dra. Paloma Lluch García, Médico Adjunta del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Dña. Isabel Pérez Monzó, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Efectos del Sorafenib, un inhibidor tirosina quinasa, en el control del tono vascular” para alcanzar el Grado de Doctora por la Universitat de València.

Valencia, febrero 2018.

Firmado:

Dr. Pascual Medina Bessó. Dra. Gloria Segarra Irlés. Dra. Paloma Lluch García.

Este trabajo ha sido subvencionado por la Universitat de València (Acciones especiales UV-INV-AE13-141529) y la Conselleria de Sanidad de la Generalitat Valenciana.

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una forma u otra, consciente o inconscientemente, han aportado su granito de arena para que este trabajo haya podido hacerse realidad.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de Tesis, Dr. Pascual Medina y Dra. Gloria Segarra, Profesores Titulares del Departamento de Fisiología, por haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte de este grupo de investigación. Gracias por su infinita paciencia. Y, sobre todo, porque me llevo un aprendizaje impagable, y no solo en el ámbito de la investigación.

Gràcies Gloria, per eixos ratets passats juntes al laboratori, per tantes xarraetes i risas, perquè he descobert i re-descobert moltes coses al teu costat. Gràcies Pascual per transmetre tanta paciència, tranquil·litat i serenitat.

Muchas gracias a la Dra. Paloma Lluch, Médico Adjunta del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y directora de la Tesis, por su ayuda y colaboración en la realización de éste trabajo y los ánimos en todo momento.

Gracias al grupo LInCE: al Dr. Carlos Hermenegildo, Catedrático de Fisiología, y a la Dra. Susana Novella, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología, por haber ayudado en todo lo posible y por todos esos momentos de “risas nerviosas”, el buen humor siempre es buena compañía. Y, cómo no, muchas gracias al resto del grupo, los “mini-LInCE”: Xavi, Dani, Ana... por los buenos momentos de las celebraciones, el buen ambiente y el apoyo. Gràcies Xavi per fer de “tècnic tecnològic” amb tanta paciència.

Gracias al Dr. Salvador Lluch, Catedrático de Fisiología, por las visitas al laboratorio y el interés mostrado en todo momento, y por los ánimos tan reconfortantes, siempre se agradecen las palabras amables y educadas.

Gracias a todas las personas que trabajan en el Animalario de la Unidad Central de Investigación de Medicina de la Universitat de València, por su disponibilidad y amabilidad siempre, en cualquier momento y a cualquier hora, especialmente a Pili, Salva y José, ha sido un placer.

Gracias a Mari, Manuel y Elena, de la Secretaría del Departamento, por estar pendientes de plazos y entregas e informarnos de todo, la gente despistada y/o agobiada agradecemos mucho los recordatorios.

Gracias a Imma, por esos momentos de desconexión que das cuando entras al laboratorio, siempre es bueno saber qué tal le va al resto, y ayudar en lo que se pueda.

Gracias a las amigas con las que embarqué en este “maravilloso mundo de la Tesis Doctoral”: Vero, Elisa y Esther, por esas reuniones para “ponernos al día” que tanto ayudan a desconectar y valorar lo que tenemos. Aunque parece mentira, ¡¡todo llega!!

Gracias a mis tíos M^a Pilar y Pepe, por mostrar tanto interés en mi trabajo y animarme en todo momento y en todo lo posible, “poquet a poquet tot arriba”, ¡Gracias!

Por último, pero no menos importante, quisiera expresar el mayor agradecimiento a mi familia, padres y hermanos, porque han estado en los buenos momentos y en los no tan buenos. Quisiera destacar el papel fundamental de mis padres, Enrique e Isabel, porque sin ellos nada de esto podría haberse hecho realidad, han sido una fuente incansable de ánimo continuo y un gran apoyo constante en cada momento.

A todos, ¡¡muchísimas gracias!!

Índice

INTRODUCCIÓN.	1
1. El hepatocarcinoma.	3
2. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores.	5
3. Expresión de VEGF y VEGFR en tumores y fármacos antiangiogénicos.	11
4. Sorafenib.	12
5. Regulación del tono vascular.	16
1.5.1. Músculo liso vascular.	16
1.5.2. Endotelio.	20
HIPÓTESIS.	25
OBJETIVOS.	29
MATERIAL Y MÉTODOS.	33
1. Animales de experimentación.	35
2. Preparación y montaje de los segmentos arteriales.	35
2.1. Montaje de la aorta.	35
2.2. Montaje de la arteria mesentérica.	36
3. Procedimiento experimental.	38
3.1. Determinación de la tensión basal óptima.	38
3.2. Comprobación de la capacidad contráctil de los segmentos aórticos.	39
3.3. Comprobación de la presencia de endotelio.	40
4. Curvas concentración-respuesta al sorafenib.	40
4.1. Papel de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la respuesta relajante al sorafenib.	41
4.2. Papel de la ciclooxigenasa (COX) en la respuesta relajante al sorafenib.	41

4.3. Papel del estrés oxidativo en la respuesta	
relajante al sorafenib.....	41
4.4. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al cloruro de potasio.....	41
4.5. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al cloruro cálcico.....	42
4.6. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al U46619.....	43
4.7. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración respuesta a la serotonina.....	44
4.8. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a noradrenalina.....	44
4.9. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a acetilcolina.....	45
4.10. Efecto del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al nitroprusiato.....	46
4.11. Efecto del sorafenib sobre la producción del	
anión superóxido en la pared vascular.....	46
5. Fármacos.....	48
6. Análisis estadístico de datos.....	49
RESULTADOS.....	51
1. Aorta.....	53
1.1. Curvas concentración-respuesta al sorafenib.....	53
1.2. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al cloruro de potasio.....	59
1.3. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al cloruro cálcico.....	62

1.4. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al U46619.....	65
1.5. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la serotonina.	68
1.6. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la acetilcolina.....	70
1.7. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al nitroprusiato.	73
2. Arteria mesentérica.....	76
2.1. Curvas concentración-respuesta al sorafenib.....	76
2.2. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al cloruro potásico.....	78
2.3. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta al U46619.....	80
2.4. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la serotonina.	82
2.5. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la noradrenalina.	84
2.6. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la acetilcolina.....	86
2.7. Efectos del sorafenib sobre las curvas	
concentración-respuesta a la nitroprusiato.....	90
3. Efecto del sorafenib sobre la producción del	
anión superóxido en la pared vascular.....	93
DISCUSION.	99
Respuesta al tromboxano A ₂	104
Respuesta a la noradrenalina.	110
Respuesta a la acetilcolina.	112

Índice

Respuesta al nitroprusiato sódico.	115
Justificación de los lechos vasculares utilizados.	120
Implicaciones clínicas.....	121
Limitaciones del estudio.....	123
 CONCLUSIONES.....	 125
 BIBLIOGRAFÍA.....	 130

Abreviaturas

ABC:	Área bajo la curva.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ANOVA:	Análisis de varianza (del inglés, ANalysis Of VAriance).
ATP:	Adenosín trifosfato.
BCLC:	Barcelona Clinic Liver Cancer.
Ca ²⁺ :	Calcio.
[Ca ²⁺] _c :	Concentración citosólica de calcio.
CaM:	Calmodulina
CaCl ₂ :	Cloruro cálcico.
CaM:	Calmodulina.
CHC:	Carcinoma hepatocelular.
ChTx:	Charibdotoxina.
COX:	Ciclooxigenasa.
cPLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂ citosólica.
DAG:	Diacilglicerol.
DHE:	Dihidroetidina.
DMSO:	Dimetil sulfóxido.
EDCF:	Factor Contráctil Derivado del Endotelio.
EDHF:	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio.
EDRF:	Factor Relajante Derivado del Endotelio.
eNOS:	Óxido nítrico sintasa endotelial.
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares.
FAK:	Quinasa de adhesión local.
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos.
FNT α :	Factor de necrosis tumoral α .
GMPC:	Guanosín monofosfato cíclico.

Abreviaturas

GTP:	Guanosín trifosfato.
Ig:	Inmunoglobulinas.
iNOS:	Óxido nítrico sintasa inducible.
IP ₃ :	Inositol 1,4,5-trifosfato.
K _{Ca} :	Canales de potasio activados por calcio.
KCl:	Cloruro potásico.
L-NAME:	N ^G -nitro-L-arginina metilester.
MAPK:	Proteína Quinasa Mitógeno Activada
MLC:	Cadena Ligera de Miosina.
MLCK:	Quinasa de la Cadena Ligera de Miosina.
MLCP:	Fosfatasa de la Cadena Ligera de Miosina.
nNOS:	Óxido nítrico sintasa neuronal.
NO:	Óxido nítrico.
NOS:	Óxido nítrico sintasa.
NP:	Nitroprusiato.
O ₂ ⁻ :	Anión superóxido.
O ₂ :	Oxígeno.
pD ₂ :	Logaritmo negativo de la concentración molar a la que se produce la mitad del efecto máximo.
PDGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas.
PI3K:	Fosfoinositol 3-quinasa.
PIP ₂ :	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato.
PIP ₃ :	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.
PGI ₂ :	Prostaciclina.
PKB:	Proteína quinasa B.
PKC:	Proteína quinasa C.

PKG:	Proteína quinasa G.
PLA:	Fosfolipasa A.
PLC:	Fosfolipasa C.
PIGF:	Factor de crecimiento placentario.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno.
ROK:	Rho quinasa.
RTK:	Receptores tirosina quinasa.
sGC:	Guanilato ciclasa soluble.
SOD:	Superóxido dismutasa.
TKI:	Inhibidor tirosina quinasa.
TxA ₂ :	Tromboxano A ₂ .
U-46619:	9,11-dideoxi-11 α ,9 α -epoximetanoprostaglandina F _{2α} .
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular.
VEGFR:	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.
VHC:	Virus de la Hepatitis C.
VPF:	Factor de permeabilidad vascular.

Introducción

El descubrimiento de mecanismos moleculares implicados en la tumorigénesis ha contribuido en gran medida a una mejor comprensión del cáncer y ha desvelado diversas vías clave de transducción de señales inter e intracelulares que han conducido al desarrollo de nuevas quimioterapias. Entre estas vías, las que implican la inhibición de la angiogénesis han sido particularmente eficaces en el tratamiento de algunos tumores sólidos con gran vascularización. El sorafenib, una de las moléculas desarrolladas para inhibir la angiogénesis, ha mostrado eficacia en el tratamiento del carcinoma hepatocelular en estadio avanzado. Además de inhibir la angiogénesis, el sorafenib podría interferir con vías de señalización intracelular que controlan el tono vascular y alterar la respuesta vasomotora frente a sustancias que producen contracción o relajación del músculo liso vascular. En esta introducción describiremos diversas vías intracelulares implicadas en el carcinoma hepatocelular, algunas vías angiogénicas y que son inhibidas por el sorafenib y las más significativas que regulan el control vasomotor.

1. El Hepatocarcinoma.

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el tumor maligno primario hepático más frecuente, representa un importante problema de salud en todo el mundo, siendo el quinto cáncer más frecuente y el tercero respecto a mortalidad secundaria a cáncer (1). En pacientes cirróticos constituye la primera causa de fallecimiento (2). La incidencia mundial del CHC excede 600.000 pacientes por año y está aumentando progresivamente (3).

El CHC asienta en más del 90% de los casos sobre un hígado cirrótico. Esto implica la consideración conjunta de la función hepática y del tumor en el manejo de estos pacientes (3). La etiología más frecuente de la hepatopatía

crónica en nuestro medio es la infección crónica por virus C de la hepatitis (VHC) y el consumo crónico de alcohol (4). Durante el desarrollo del CHC, los hepatocitos proliferan produciendo un aumento de los niveles de las citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Los cambios genéticos y epigenéticos conducen a la formación de hepatocitos displásicos y finalmente a CHC (5).

El sistema de estadiaje y tratamiento actualmente establecido para el manejo de pacientes con CHC es el Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC). Establece cinco estadios considerando aspectos inherentes al tumor (número y tamaño de los nódulos, invasión vascular macroscópica y existencia o no de metástasis a distancia), aspectos relativos a la función hepática y aspectos relacionados con las comorbilidades del paciente. Así pues, se establecen tres grandes grupos del CHC en los que se consideran diversos tratamientos: estadios precoces (BCLC 0 y BCLC A) que incluyen tumores pequeños, sin invasión vascular ni metástasis a distancia y buena función hepática, el estadio intermedio (BCLC B), que incluye tumores más grandes sin invasión vascular ni metástasis y con función hepática preservada y estadio avanzado (BCLC C) en los que independientemente del tamaño del tumor, existe invasión vascular macroscópica y/o metástasis a distancia, siempre con función hepática preservada. El estadio D agrupa los pacientes que por lo avanzado del tumor o de sus comorbilidades son únicamente subsidiarios de tratamiento sintomático. Los estadios precoces se benefician de terapias con intención curativa (radiofrecuencia, resección quirúrgica o trasplante hepático); en el estadio intermedio se realiza terapia ablativa local mediante quimioembolización y en el estadio avanzado, el único tratamiento que ha demostrado aumento de la supervivencia es la quimioterapia sistémica, en concreto el sorafenib (6, 7).

El CHC es una enfermedad particularmente heterogénea y muchos procesos patogénicos contribuyen a la carcinogénesis (8). Varias rutas carcinogénicas se han identificado en el desarrollo y progresión del CHC y ello permite proporcionar nuevas dianas moleculares para el tratamiento del CHC (8). Algunos fármacos que afectan a estas rutas tienen como diana al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *Vascular endothelial growth factor*), sus receptores (VEGFR) y sus vías de señalización intracelular.

2. El factor de crecimiento endotelial vascular y sus receptores.

Los VEGFs representan una familia de glicoproteínas homodimérica con un peso molecular de 45 kDa. Tienen una importante función en diferentes procesos, como el desarrollo del sistema vascular (vasculogénesis), sistema linfático (linfangiogénesis) y la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (angiogénesis) (9). Los VEGFs son secretados como proteínas homodiméricas unidas covalentemente y estabilizadas por puentes disulfuro intra e intercatenarios (10, 11). Dentro de la familia VEGF, en mamíferos, se han identificado cinco ligandos: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, y una molécula relacionada estructuralmente, el factor de crecimiento placentario (PlGF). Estos ligandos se unen con alta afinidad a tres tipos diferentes de receptores tirosina quinasa, pero estructuralmente relacionados, receptores VEGF (VEGFRs): VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Los receptores del VEGF son monómeros que constan de siete dominios extracelulares semejantes a inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana, uno yuxtamembrana, y finalmente dos dominios tirosina quinasa y el extremo carboxiterminal intracelular. Cuando el ligando se une a su receptor, éstos dimerizan y se fosforilan los dominios tirosina quinasa, con lo que transducen la señal al interior de la célula (12).

El VEGFR1 se expresa en células endoteliales de los vasos sanguíneos, células madre hematopoyéticas, monocitos y macrófagos. Su activación media la migración, la permeabilidad celular, el desarrollo de células hematopoyéticas y la producción de metaloproteasas. El VEGFR2 se expresa en células endoteliales de los vasos sanguíneos y de los vasos linfáticos y tiene un papel importante en el desarrollo de las células endoteliales linfáticas, así como en la regulación de actividades proliferativas, mitogénicas y de adherencia vascular del VEGF. El VEGFR3 se expresa de forma restringida en células endoteliales linfáticas y participa en el desarrollo de las células endoteliales linfáticas (9).

En cuanto a la unión de los ligandos a sus receptores, las distintas isoformas del VEGF se unen de forma específica a sus receptores. El VEGFA se une tanto a VEGFR1 como a VEGFR2, mientras que PlGF y VEGFB se unen exclusivamente a VEGFR1. VEGFC y VEGFD se expresan inicialmente como propeptidos que se unen a VEGFR3, una vez que estos factores maduran y son procesados proteolíticamente pueden unirse también a VEGFR2 (13) (**Figura 1**).

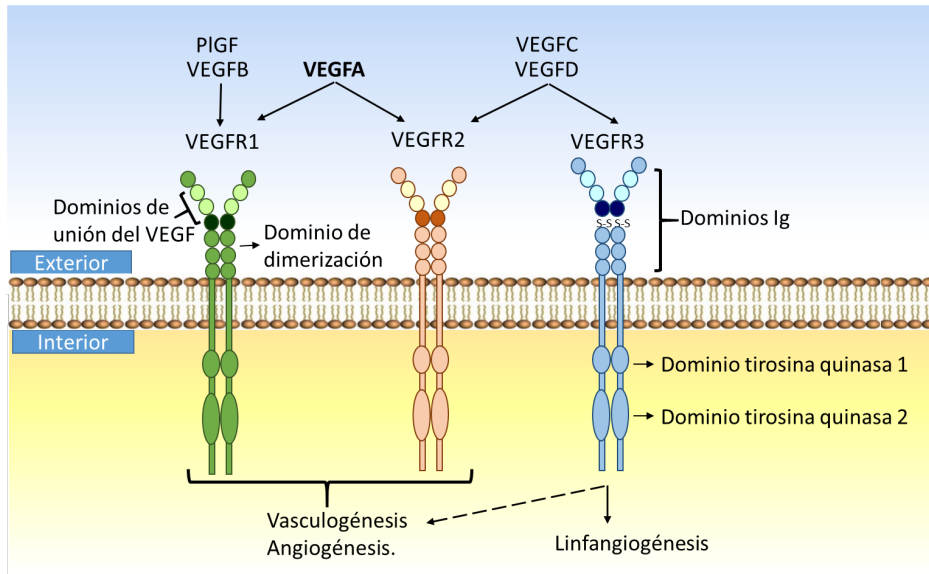


Figura 1. Miembros que componen la familia de los VEGFs y sus receptores. Los ligandos VEGF en mamíferos comprenden una familia de cinco miembros, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PIGF). El VEGFA se une tanto al receptor 1 de VEGF (VEGFR1) como al VEGFR2. El VEGFB y el PIGF se unen exclusivamente a VEGFR1. Finalmente, VEGFC y VEGFD se unen a VEGFR2 y VEGFR3. Tomado y modificado de Ellis y Hicklin 2008. (14).

El VEGFA es producido por una serie de células entre las que se encuentran las células de músculo liso vascular, macrófagos y células tumorales. En humanos, la forma activa más abundante es el VEGFA165, un homodímero de 46 kDa compuesto por dos subunidades de 23 kDa (15). El VEGFA se une al segundo y tercer dominio inmunoglobulina extracelular del VEGFR2 (16, 17). La unión del ligando induce la dimerización del receptor y la autofosforilación. Una vez los dos receptores se han unido entre ellos, por interacción simultánea con el ligando, los 7 dominios inmunoglobulina de la membrana proximal se encuentran muy cercanos por lo que existen interacciones homotípicas de baja afinidad entre estos dominios que estabilizan la dimerización del receptor (18). Esta interacción permite el correcto posicionamiento de los dominios quinasa

intracelulares produciendo la autofosforilación. En dicho proceso se fosforilan residuos de tirosina específicos en el receptor creando una secuencia consenso para el reclutamiento de proteínas intracelulares específicas que se unirán mediante dominios SH2 (Src Homology 2) (9), que son dominios muy conservados en proteínas implicadas en la transducción de señales intracelulares (19).

El VEGFR2 es el principal receptor que promueve la acción proangiogénica del VEGFA y ha sido la principal diana de las terapias antiangiogénicas, aunque estudios adicionales destacan la importancia de la señalización a través de VEGFR1 en los procesos angiogénicos (20). El VEGFR2 es un receptor tirosina quinasa transmembrana tipo III, que fue aislado por primera vez en 1991 por Terman y colaboradores (21). En el adulto, el VEGFR2 se expresa principalmente en células endoteliales vasculares, aunque su expresión también es detectable en neuronas, megacariocitos y células madre hematopoyéticas (22).

El VEGFR2 juega un papel crítico en la angiogénesis tumoral, un proceso importante para el crecimiento y progresión de tumores sólidos, así como en los procesos de metástasis (23). Durante el proceso tumoral el VEGFR2 es activado por señales extracelulares iniciando una vía de señalización intracelular para regular la actividad celular. Entre los principales efectos de la activación del VEGFR2 se encuentra la proliferación, migración y supervivencia celular, y el incremento de la permeabilidad vascular.

El VEGFR2 es el principal mediador de importantes efectos fisiológicos y patológicos del VEGFA en las células endoteliales. Al igual que otros receptores tirosina quinasa su activación induce proliferación celular por

activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*). La activación del VEGFR2 estimula la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) que promueve la conversión del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), sustancias que activan la proteína quinasa C (PKC), quinasa que inicia una ruta de fosforilaciones que desemboca en la fosforilación de ERK y en la proliferación celular (24) (**Figura 2**).

El VEGFR2 también está involucrado en la migración de las células endoteliales, un componente crítico de la respuesta angiogénica donde las células endoteliales se movilizan mediante la acción de proteasas que degradan la membrana basal, a través de un gradiente de concentración de VEGF y la participación de otros factores de crecimiento (25).

La activación del VEGFR2 induce la activación de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) que produce el segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) en la membrana celular que lleva a la fosforilación y activación de la proteína quinasa B (PKB), ésta a su vez fosforila y activa a la quinasa Akt (26). Akt directamente fosforila las proteínas apoptóticas, BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo la supervivencia celular (27, 28) (**Figura 2**). VEGFA también induce la expresión de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y A1 (29) y de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs, *Inhibitors of apoptosis proteins*), que inhiben a los efectores finales que inducen apoptosis, la caspasa 3 y 7 (30).

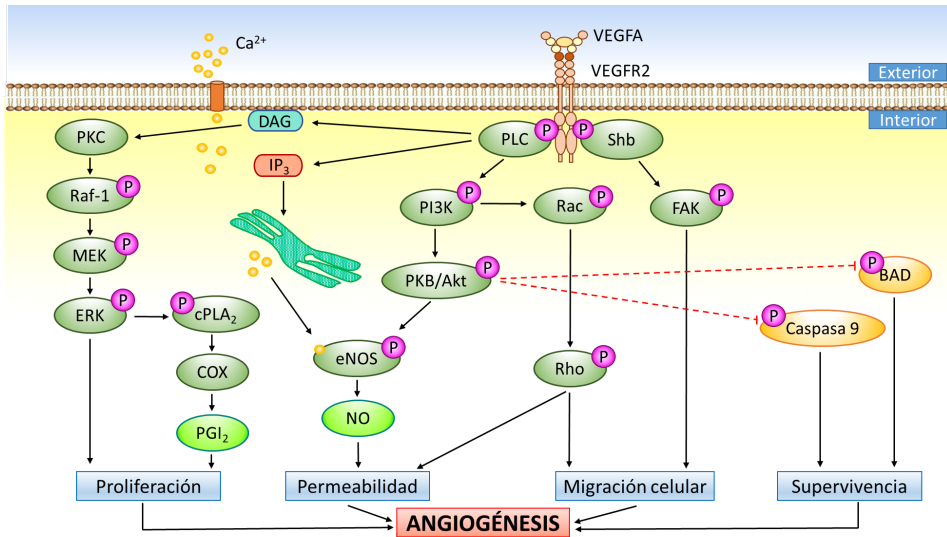


Figura 2. Esquema de las vías de señalización del VEGFR2. La unión del VEGFA al receptor induce la dimerización y autofosforilación de residuos tirosina específicos en dominios intracelulares del VEGFR2. La activación de rutas de señalización intracelular por el VEGFA lleva a la proliferación, migración, y supervivencia celular e incremento de la permeabilidad celular. Figura tomada y modificada de Holmes *et al.*, 2007 (9).

El VEGFA fue originalmente descubierto como un factor que incrementaba la permeabilidad vascular (VPF, *Vascular Permeability Factor*) (31), un efecto que juega un papel importante en condiciones fisiológicas y patológicas como la hiperpermeabilidad tumoral. La permeabilidad inducida por el VEGF requiere de óxido nítrico (NO) que es sintetizado por la NO sintasa endotelial (eNOS) (32). La actividad de la eNOS es estimulada por el incremento de la concentración de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_c) que es dependiente de la activación de la PLC- γ o por la fosforilación de la eNOS mediada por la quinasa Akt (33, 34) (**Figura 2**).

El VEGFA también induce vasodilatación, provocando aumento del flujo sanguíneo en los tejidos. Este efecto del VEGFA está mediado por el receptor

VEGFR2 cuya activación induce la síntesis de NO y prostaciclina (PGI₂) que actúan en las células del músculo liso vascular provocando relajación (35). La activación del VEGFR2 lleva a la síntesis de PGI₂ por una vía que requiere un incremento en el Ca²⁺ citosólico y la fosforilación de la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) mediada por ERK 1/2 (36, 37). La cPLA₂ hidroliza fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidónico, el cual es metabolizado por las ciclooxigenasas (COX) y posteriormente por la PGI₂ sintasa generando PGI₂, que es liberada por la célula endotelial (37).

3. Expresión de VEGF y VEGFR en el CHC.

La angiogénesis está estrechamente relacionada con la hepatitis crónica y la fibrogénesis hepática, lo que a su vez puede conducir a cirrosis y CHC (38). La ruta del VEGF ha sido identificada como el principal impulsor de la angiogénesis tumoral en el CHC (39, 40). Sin embargo, la activación y/o regulación positiva de abundantes rutas de señalización proangiogénicas puede llevar a la resistencia de la terapia antiangiogénica basada en el VEGF, reinduciendo la angiogénesis tumoral y subsecuentemente resultando en la progresión del tumor (41). El VEGF es un factor muy importante en el desarrollo de la angiogénesis, así como en la fibrogénesis en la hepatopatía crónica, pero otras citoquinas, factores de crecimiento y metaloproteinasas también podrían estar implicadas en estos procesos de forma importante (42).

El VEGF y su receptor están sobreexpresados en la mayoría de células hepáticas del carcinoma. Su expresión se induce durante la formación del tumor por estímulos ambientales como la hipoxia o por mutaciones genéticas como *K-ras*, *p53* o *HER2/ErbB2* (9). La expresión del VEGFR2 está aumentada en la vasculatura tumoral respecto a la vasculatura normal (43). De hecho, se ha

propuesto la expresión del VEGFR2 como un marcador pronóstico en pacientes con diversos tumores (44, 45).

La formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para el proceso de crecimiento tumoral, invasión y la diseminación metastásica (46). Las interacciones entre tumor y estroma producen VEGFs, particularmente VEGFA, y VEGFRs, particularmente VEGFR2, que son importantes mediadores de la angiogénesis y el incremento de la permeabilidad vascular tumoral (47). A principios de los años 70, Folkman propuso que la inhibición de la angiogénesis provocaría la disminución del crecimiento tumoral (48). Esta visión se ha convertido en realidad, con la llegada de numerosos fármacos antiangiogénicos a la práctica clínica (44). Las estrategias terapéuticas dirigidas a la inhibición de la angiogénesis pueden dividirse en dos grupos, los fármacos cuya diana son los ligandos VEGF, como los anticuerpos monoclonales anti-VEGF como el bevacizumab (49) y los fármacos cuya diana es el receptor de superficie celular VEGFR2, como el pazopanib y el sorafenib.

4. Sorafenib.

El sorafenib es un inhibidor multiquinasa y antiangiogénico considerado el tratamiento de elección para pacientes con CHC en estadio avanzado (50). Hasta el empleo de sorafenib en la práctica clínica del CHC avanzado, no había opciones de tratamiento en este grupo de pacientes. En el desarrollo de este trabajo nos centramos en el estudio del quimioterápico sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®, Bayer, Pharmaceuticals Corp. and Onyx Pharmaceuticals Inc.). El sorafenib es un compuesto bis-aril urea que muestra un gran efecto anticancerígeno, que ha sido aprobado por la Agencia Americana del Medicamento (FDA, por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*, USA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA, por sus

siglas en inglés *the European Medicines Agency*) para el tratamiento del CHC en estadio avanzado (51-55).

El sorafenib una pequeña molécula que actúa directamente contra varios objetivos bloqueando la activación de varias proteínas intracelulares importantes para la progresión del tumor, entre los que se incluyen los receptores VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGFR β , *Platelet-derived growth factor receptor* β), y de otros receptores tirosina quinasa como el c-Kit y RET (56, 57), asimismo inhibe a las quinasas Raf, pertenecientes a la serie de quinasas Raf/MEK/ERK (**Figura 3**). Ejerce un efecto directo en la proliferación y supervivencia de las células tumorales, pero principalmente actúa en células endoteliales para inhibir la angiogénesis inducida por el tumor (52, 58), disminuyendo el crecimiento tumoral e inhibiendo la angiogénesis en pacientes con CHC avanzado (50, 56).

Los fármacos antiangiogénicos como el sorafenib ya han demostrado clínicamente una actividad significativa frente al CHC, siendo el primer tratamiento aprobado para pacientes con CHC avanzado (50, 59). Teóricamente, el CHC debería ser propenso a la inhibición de la angiogénesis porque es un tumor altamente vascularizado y la hipervascularización es una característica esencial del CHC estrechamente relacionada a la carcinogénesis (41, 60).

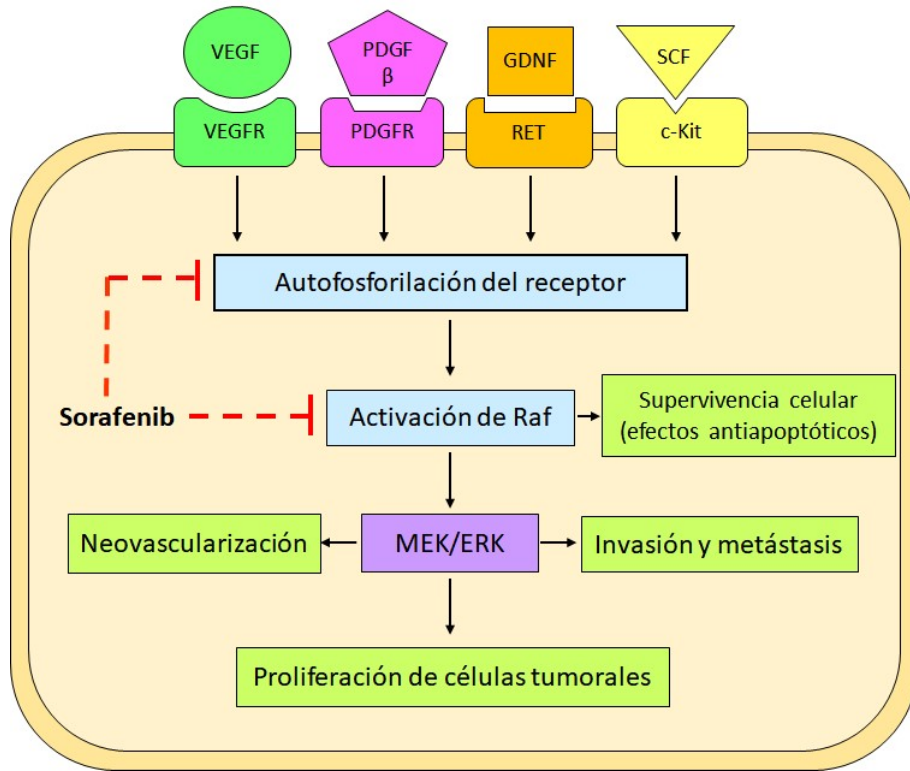


Figura 3. Dianas celulares del sorafenib. El sorafenib bloquea la señalización de diversos receptores tirosina quinasa como: VEGFR, PDGFR, RET y c-Kit e inhibe la actividad de una serina/treonina quinasa que se encuentra en la ruta de señalización activada por los receptores llamada Raf para prevenir el crecimiento tumoral mediante efectos antiangiogénicos, antiproliferativos y/o proapoptóticos. Quinasa regulada por señales extracelulares (*ERK*, *Extracellular signal-regulated protein kinase*); factor neurotrófico derivado de la glía (*GDNF*, *Glial-derived Neurotrophic Factor*); proteína quinasa activada por mitógeno (*MAPK*, *Mitogen-activated protein kinase*); protein quinasa de MAPK (*MEK*, *MAPK kinase*); receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGRF*, *Platelet-derived growth factor*); factor de células madre (*SCF*, *Stem cell factor*); receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGFR*). Tomado y modificado de Wilhelm *et al.*, 2006 (61).

Respecto a los efectos del sorafenib sobre la inhibición de la proliferación celular del tumor y la inducción de la muerte celular, el sorafenib ejerce estos efectos a través de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK (52). En humanos, las

alteraciones generadas por el CHC muestran una alta expresión y actividad de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) comparada con la de hígados no neoplásicos (62). Por otra parte, el sorafenib inhibe la vía Raf/MEK/ERK incrementando la producción de radicales libres de oxígeno (ROS, *Reactive oxygen species*) en el CHC (63). El efecto citotóxico y citostático del sorafenib está mediado inicialmente por el anión superóxido (O_2^-), que puede interactuar con proteínas, lípidos y ADN causando daños celulares irreversibles (64).

El O_2^- puede ser generado principalmente por tres vías: la NADPH oxidasa citosólica, la xantina oxidasa y los complejos I y III de la cadena respiratoria de las mitocondrias. De estas tres vías, se ha demostrado que la NADPH oxidasa es la mayor fuente de ROS en células de hepatocarcinoma humano (65). La activación de la NADPH oxidasa podría ser causada directamente por el sorafenib o bien por inhibir la señalización del VEGF, reduciendo la angiogénesis tumoral y el aporte de oxígeno (66). La hipoxia en el tumor produciría un incremento en la producción de ROS que serían las responsables de la citotoxicidad y muerte celular inducidas por el sorafenib (66).

El sorafenib puede utilizarse con un perfil de seguridad aceptable en la práctica clínica. Sin embargo, los efectos adversos pueden alterar significativamente la calidad de vida y pueden aconsejar la reducción de la dosis diaria. Aunque los efectos secundarios más frecuentes tras el tratamiento con sorafenib son diarrea y reacciones cutáneas (50), los trastornos cardiovasculares no son infrecuentes y pueden variar a lo largo del tratamiento. Durante las primeras semanas puede observarse un aumento de la presión arterial, en general leve y de fácil manejo (67). También se ha descrito la aparición de alteración del ritmo cardíaco en forma de fibrilación auricular o bradicardia a lo largo del tratamiento, la media

de aparición es de 93,5 días. A pesar de que la presencia de isquemia cardiaca o infarto en el estudio SHARP fue similar en los pacientes que recibían placebo o sorafenib (1 vs. 3%) (50), se recomienda control de síntomas sugestivos de cardiopatía isquémica. La mediana de aparición de eventos isquémicos o trombosis es de 290 días (67). Como hemos descrito anteriormente, el sorafenib interacciona con numerosas vías intracelulares, algunas de ellas importantes en el control vasomotor, sin embargo, por el momento, desconocemos los efectos del sorafenib sobre la regulación del tono vascular.

5. Regulación del tono vascular.

Estructuralmente la pared vascular puede dividirse en tres capas bien diferenciadas dispuestas concéntricamente, cada una de ellas separada por una fina membrana elástica. Desde el exterior hacia la luz del vaso sanguíneo se encuentra la capa adventicia, la media y la íntima. En general, el tono vasomotor está regulado por la influencia simultánea y coordinada de sustancias vasoactivas circulantes (hormonas y derivados plaquetarios), productos celulares perivasculares y neurotransmisores.

Músculo liso vascular.

La capa media de la pared vascular, formada principalmente por músculo liso, actúa como sistema efector donde se produce la contracción y relajación vascular en respuesta a distintos estímulos. El incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en las células de músculo liso desencadena el proceso de contracción. El Ca^{2+} puede proceder del medio extracelular, por entrada del Ca^{2+} a través de canales iónicos, o bien de los almacenes intracelulares, que pueden ser estimulados por distintos agentes. La concentración de Ca^{2+} varía de manera importante entre el interior celular, donde la concentración de Ca^{2+} es sólo de 10^{-4} mM, y el exterior celular, donde varía entre 1 y 2 mM. Cuando se produce una entrada transitoria

de Ca^{2+} se produce un cambio brusco en las concentraciones plasmáticas de Ca^{2+} y éste actúa como un segundo mensajero que puede activar diversos procesos celulares.

Un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inicia el proceso de contracción, el Ca^{2+} se une a la calmodulina para formar el complejo Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) (68), que activa a la quinasa de la cadena ligera de miosina (*Myosin Light Chain Kinase*, [MLCK]) (69-71). Una vez activada la MLCK fosforila a la cadena ligera de miosina de 20 kD (*Myosin Light Chain 20*, [MLC₂₀]), proteína que forma un pequeño anillo alrededor de la región que forma el cuello de la cadena pesada de miosina. Esta fosforilación permite a la actina interactuar con la miosina y activar la actividad ATPasa de la miosina. La ATPasa escinde enlaces fosfato de alta energía del ATP que proporciona la energía necesaria para el ciclo de puente cruzado de actina-miosina que produce el deslizamiento de los filamentos de actina sobre los de miosina que hace que estos se solapen, produciendo la fuerza para la contracción muscular (72-74).

La relajación del músculo liso se produce por la desfosforilación de la MLC₂₀ por acción de la fosfatasa de la MLC (*Myosin Light Chain Phosphatase*, [MLCP]) (75, 76). La MLCP es un heterotrímero con una subunidad catalítica, una subunidad de 20 kDa con funciones desconocidas y una subunidad reguladora llamada MYPT1, que dirige a la MLCP hacia la miosina (75, 76). La MLCP inactiva la ATPasa de actomiosina deshaciendo este complejo y quedando el aparato contráctil en la situación de reposo (74).

El grado de fosforilación de MLC₂₀ y, por lo tanto, el tono del músculo liso está determinado por las actividades relativas de MLCK y MLCP. Una disminución de los niveles de Ca^{2+} conduce a la inactivación de la MLCK y a la activación

de la MLCP. Cuando los niveles de Ca^{2+} superan un umbral, se activa MLCK e inhiben la actividad de la MLCP. En esta visión general de la regulación de la contracción del músculo liso por la actividad de la miosina y el grado de fosforilación de MLC_{20} , hay que mencionar que la interacción de la actina y la miosina está regulada además de forma independiente de la fosforilación de MLC_{20} , por la caldesmona y la calponina, proteínas unidas a los filamentos finos, (77-79). Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ es baja, la tropomiosina se une a la actina, disminuyendo la interacción actina-miosina, con lo que el músculo permanece relajado. El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ hace que se forme el complejo Ca^{2+} -CaM que se une a caldesmona y calponina, y estas proteínas separan a la tropomiosina de la actina, que puede interaccionar con la miosina y producir la contracción del músculo (80).

Hay dos mecanismos mediante los cuales los estímulos pueden aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en la célula muscular lisa y provocar contracción (72). El primer mecanismo involucra estímulos que provocan despolarización de la membrana, que induce la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la entrada de Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímico. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se activan ante estímulos que despolarizan la membrana celular, permaneciendo cerrados en situación de potencial de reposo y abriéndose ante una despolarización de suficiente amplitud. De los distintos tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje que se han descrito, en las células de músculo liso vascular se expresan los de tipo-L (Cav1), y en menor medida los de tipo-T (Cav3). Los de tipo-L constituyen la vía de paso de Ca^{2+} de mayor importancia hacia el interior celular, y están directamente implicados en la contracción muscular (81, 82). Esto les concede un importante interés clínico, ya que sus bloqueantes como la nifedipina, el verapamilo y el diltiazem son eficaces fármacos antihipertensivos (83, 84). Un grupo de estos fármacos bloqueantes de

los canales de Ca^{2+} son las dihidropiridinas, por este motivo a los canales tipo-L también se les denomina canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas.

Existe una gran diversidad de sustancias o factores que pueden incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sin producir cambios en el potencial de membrana. En lugar de provocar contracción despolarizando el potencial de membrana, la contracción es provocada por la unión de un agonista a un receptor de membrana (72). Después de esta unión al receptor, se producen moléculas intracelulares o segundos mensajeros que provocan la liberación de Ca^{2+} . Para varios agonistas, entre los que se incluyen la noradrenalina, la serotonina, la vasopresina, el tromboxano A_2 y la angiotensina, la vía involucra al fosfolípido de membrana PIP_2 . La unión de estos agonistas a sus receptores específicos en la membrana plasmática activa a la PLC, una enzima que escinde PIP_2 , en dos segundos mensajeros: IP_3 y DAG. El IP_3 , aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ al estimular la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico y otros orgánulos intracelulares. El DAG aumenta el contenido de Ca^{2+} intracelular al activar la PKC, que puede abrir canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y un segundo tipo de canales de membrana permeable al Ca^{2+} , los canales de Ca^{2+} operados por receptor (73, 85-90).

A mediados de la década de 1980, Morgan y colaboradores (91) demostraron que en presencia de fenilefrina, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en el músculo liso vascular es más eficaz manteniendo la fuerza que en presencia de altas concentraciones extracelulares de K^+ , que producían despolarización del potencial de membrana. En términos generales, el estímulo del músculo liso con agonistas que activan receptores acoplados a proteína G produce una relación fuerza- $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se desplaza hacia la izquierda en comparación con el estímulo del músculo liso con concentraciones despolarizantes de K^+ , un fenómeno ahora denominado sensibilización al Ca^{2+} (92). La desensibilización al Ca^{2+} , a su vez, se refiere al

fenómeno en el que la vasodilatación inducida por nucleótidos cíclicos puede ocurrir sin una disminución concomitante en la $[Ca^{2+}]_c$ (91).

Experimentos iniciales demostraron que agonistas que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G aumentan la sensibilidad al Ca^{2+} a través de la inhibición de la MLCP (93, 94). Los agonistas contráctiles cuyos receptores están acoplados a proteínas G heterotriméricas activan a la Rho A (95, 96). La activación de Rho A, por fosforilación con GTP lleva a la activación de su efector la quinasa de Rho A (ROK o ROCK, de aquí en adelante ROK) (97, 98). Finalmente, la ROK es responsable de la inhibición de la MLCP (99, 100), al fosforilar su subunidad MYPT1 e inhibir su actividad (101, 102). En los años posteriores, la disponibilidad de inhibidores específicos de la ROK (103, 104), como el Y27632, demostró abrumadoramente la importancia de la señalización Rho/ROK en la regulación de la contracción del músculo liso en condiciones fisiológicas y patológicas.

Aunque inicialmente la sensibilidad al Ca^{2+} del músculo liso estaba asociada a la activación de receptores acoplados a proteínas G, otros trabajos muestran que la despolarización con elevadas concentraciones extracelulares de K^+ induce la activación de la ROK, y por tanto produce un aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} (105).

El endotelio.

El endotelio vascular es la capa de células que reviste la cara interna de los vasos. Las células del endotelio vascular participan en un número importante de funciones celulares y homeostáticas tales como la coagulación sanguínea, la actividad de los leucocitos, la agregación y adhesión de las plaquetas, la permeabilidad capilar y la regulación del tono del músculo liso vascular (106).

El endotelio regula el tono del músculo liso vascular mediante la producción y liberación de potentes agentes vasodilatadores y constrictores. Además, indirectamente interviene en la regulación del tono vascular metabolizando diversas sustancias vasoactivas.

Furchgott y Zawadzki en 1980, usando preparaciones de aorta de conejo, demostraron que la administración de acetilcolina y otros agentes muscarínicos, producían relajación únicamente en presencia de endotelio, a través de la síntesis y liberación de agentes humorales de origen endotelial (107). Estos agentes llamados por Furchgott factores relajantes derivados del endotelio (EDRFs, *Endothelium-dependent relaxing factors*), son extremadamente lábiles, teniendo una vida media de segundos en solución fisiológica (108). Se ha identificado como uno de los factores relajantes derivados del endotelio al NO (109). El NO se sintetiza a partir del nitrógeno guanidino terminal del aminoácido L-arginina (110, 111), por la sintasa de NO (NOS) (106). Las NOS pueden ser de dos tipos, constitutiva e inducible (112). Las isoformas constitutivas, endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), son dependientes de Ca^{2+} y calmodulina (113, 114). La eNOS se localiza en células endoteliales, plaquetas y células mesangiales renales, mientras que la nNOS es de localización neuronal (115). La isoforma inducible (iNOS) es Ca^{2+} independiente y se expresa tras estímulos inflamatorios en las células endoteliales, células de músculo liso vascular y macrófagos.

El NO formado y liberado por el endotelio, por su pequeño tamaño y alta lipofilia puede, de forma rápida y fácil, difundir hacia las células del músculo liso vascular; dentro de éstas, interacciona con el grupo hemo de la guanilato ciclasa (116) activando la enzima y aumentando la concentración de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) que activa la protein quinasa G (PKG) (117, 118).

Este proceso favorece la apertura de canales de K^+ e hiperpolariza la membrana plasmática, lo que limita la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, e inhibe la entrada de Ca^{2+} extracelular y por lo tanto favorece la vasodilatación (118, 119).

Los nitrovasodilatadores, como el nitroprusiato sódico, se utilizan en clínica desde hace tiempo en crisis hipertensivas, insuficiencia cardiaca, isquemia coronaria y para mantener una hipotensión en cirugía. Estos compuestos ejercen su acción por generar NO (120) y aumentar los niveles de GMPc y de este modo producen la relajación del músculo liso vascular (121-123).

El NO no es el único factor relajante derivado del endotelio. La PGI_2 es una prostaglandina relajante producida por las células endoteliales que fue descubierta en 1976 (124). Alteraciones químicas o mecánicas de las membranas celulares llevan a la formación y liberación de prostaglandinas (125). En las células endoteliales, la presión pulsátil, algunas sustancias endógenas y exógenas activan la generación de PGI_2 . La producción de PGI_2 comienza con la activación de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) que libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana (126, 127). Posteriormente la COX convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos de prostaglandina y finalmente la sintasa de PGI_2 forma la PGI_2 a partir del endoperóxido de la prostaglandina H_2 (128).

La PGI_2 es un poderoso vasodilatador y además inhibe la agregación plaquetaria a través de la activación de la adenilato ciclasa, lo cual lleva a un incremento del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (129). La PGI_2 es un autacoide, que actúa localmente, más que una hormona circulante. La liberación de PGI_2 por las

células endoteliales afecta a su entorno, abluminalmente causa relajación del músculo liso subyacente, y luminalmente previene la agregación plaquetaria.

El endotelio también produce una sustancia humoral difusible que produce hiperpolarización de las células del músculo liso vascular, y es conocida como factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*) (130). Éste fue descubierto cuando algunos investigadores obtuvieron relajación inducida por una sustancia de origen endotelial, incluso cuando la producción de NO y prostaglandinas estaba bloqueada. Se han propuesto diversas sustancias que podrían actuar como EDHF, entre ellas, el ácido epoxieicosatrienoico (131-133), el peróxido de hidrógeno (134, 135), la anandamida (136), el péptido natriurético tipo C (137) y el K^+ (138). Aunque se han descrito diversas sustancias que pueden actuar como EDHF y que su participación en el control del tono vascular puede variar en función del lecho vascular estudiado y de las condiciones fisiopatológicas en las que se ha estudiado el vaso, parece que hay un consenso de que en todos los casos el EDHF participa a través de la activación de canales de K^+ activados por Ca^{2+} en la célula muscular y que la salida del K^+ hiperpolariza la célula muscular lisa con la consiguiente relajación (139).

La participación del endotelio en la regulación cardiovascular es más compleja de lo que inicialmente se había pensado, puesto que las células endoteliales no solo liberan factores dilatadores, sino que además producen diversas sustancias que contraen el músculo liso subyacente, los factores contráctiles derivados del endotelio (EDCFs *Endothelium-derived contracting factors*). Yanagisawa et al. (1988) (140) identificaron uno de estos factores contráctiles como un péptido de 21 aminoácidos llamado endotelina. Las células endoteliales producen exclusivamente la endotelina-1 que produce vasodilatación a bajas

concentraciones, y una marcada constricción cuando se incrementa la concentración (140, 141). Otro EDHF es el O_2^- . Sus acciones vasculares dependientes del endotelio, son debidas a la inactivación del NO que puede dar lugar a peroxinitrito (142) y por otra parte favorecer la síntesis de sustancias prostanoides contráctiles de origen endotelial (143-146).

El endotelio venoso y el de algunas arterias, puede producir contracción del músculo liso subyacente, mediada por el tromboxano A_2 o la prostaglandina H_2 en respuesta a agonistas como el ácido araquidónico, la acetilcolina, la histamina y la serotonina (147). Tanto el tromboxano A_2 como la prostaglandina H_2 activan el receptor del tromboxano en el músculo liso vascular y en las plaquetas y de este modo contrarresta el efecto del NO y la PGI_2 . Además, la activación de la COX es una fuente de O_2^- .

Para finalizar, el endotelio regula la actividad de la enzima convertidora de angiotensina I en angiotensina II (148). La angiotensina II puede activar los receptores endoteliales para la angiotensina. Estos receptores estimulan la producción de endotelina y posiblemente la de otros mediadores tales como el factor inhibidor de la activación del plasminógeno.

Hipótesis

Los tumores sólidos, independientemente de su tipo y origen, necesitan para su crecimiento oxígeno y nutrientes que únicamente pueden ser suministrados por un buen aporte sanguíneo. Por este motivo, las células tumorales estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la producción de factores, como el VEGF, un mitógeno específico endotelial y factor de supervivencia, que se encuentra entre los factores angiogénicos más potentes (149).

El VEGF se une a sus receptores VEGFR, pertenecientes a la familia de receptores tirosina quinasa, que entre las acciones que provoca, favorece la síntesis endotelial de NO (150, 151). Se ha demostrado que el NO a bajas concentraciones, promueve la angiogénesis y proliferación de células endoteliales. Además, el NO podría también modular otros procesos como el ciclo celular, la invasión tumoral y la aparición o progresión de metástasis. En las células endoteliales, el VEGF incrementa la síntesis de NO al menos por dos vías, la primera por incrementar la $[Ca^{2+}]_c$ y la segunda mediante la activación de la vía PI3K/PKB/Akt que va a fosforilar la eNOS incrementando su actividad (34, 152).

El sorafenib, un inhibidor multiquinasa, inhibe los efectos de la unión del VEGFA al receptor VEGFR2, inhibiendo o alterando diversas rutas de señalización intracelular, disminuyendo la formación de NO y PGI₂. Estas sustancias son importantes mediadores en el control del tono vascular, y por lo tanto una hipótesis de la presente Tesis es que el sorafenib podría alterar la respuesta del músculo liso vascular a sustancias vasoactivas.

Varios fármacos quimioterapéuticos ejercen sus efectos citotóxicos a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (153). El Sorafenib inhibe la vía

MEK/ERK que controla la producción de especies reactivas de oxígeno en el CHC, el sorafenib podría alterar el control del tono vascular mediante la producción de especies reactivas de oxígeno.

La migración celular es un proceso similar al de la contracción de la célula muscular lisa. Esta similitud permite hipotetizar que las vías de señalización implicadas en la migración celular también pueden modular la actividad de las proteínas contráctiles o de las que regulan su funcionamiento. Diversos estudios han descrito el papel funcional de la vía de señalización Raf-1/MEK/ERK en la regulación de la migración de células musculares lisas (154, 155). El sorafenib es un inhibidor de la quinasa Raf-1 y su inhibición podría alterar la regulación de la contracción del músculo liso vascular. Algunos de los mecanismos que regulan el tono vascular son diferentes dependiendo del lecho vascular estudiado, de tal manera que puede que cada lecho vascular se vea afectado de forma diferente por el sorafenib.

Objetivos

El sorafenib, un inhibidor multiquinasa utilizado en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, inhibe la vía de señalización del receptor VEGFR2 disminuyendo la angiogénesis y el aporte sanguíneo al tumor. Sin embargo, hasta el momento se desconocen los efectos directos del sorafenib sobre la pared vascular. El objetivo principal de la presente Tesis fue determinar los efectos del sorafenib sobre la regulación del tono vascular de vasos de conductancia y en pequeños vasos musculares.

Objetivos específicos son:

Determinar en aorta y de arteria mesentérica los efectos del sorafenib sobre:

1. La contracción independiente de la activación de receptor inducida por el KCl y el CaCl₂.
2. La contracción mediada por activación de receptor inducida por el tromboxano A₂, serotonina y noradrenalina.
3. La relajación dependiente de endotelio y mediada por la acetilcolina.
4. La relajación independiente de endotelio mediada por nitroprusiato sódico.
5. Los niveles de anión superóxido y su posible interacción con el tromboxano A₂, una sustancia que incrementa los niveles de anión superóxido.

El desarrollo de los objetivos permitirá determinar los efectos del sorafenib sobre los mecanismos de contracción y relajación del músculo liso vascular y sobre los niveles de anión superóxido y del NO derivado del endotelio.

Material y métodos

1. Animales de experimentación.

Para realización del estudio se utilizaron ratones adultos macho de la cepa AKR/J de edades comprendidas entre los 7 y 9 meses (29 - 33 g de peso). Los ratones se obtuvieron de la colonia mantenida en el servicio de estabulación animal de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Los ratones se mantuvieron de acuerdo a las directrices institucionales (temperatura constante a 22° C, ciclo luz/oscuridad de 12 h, humedad del 60%, comida estándar y agua *ad libitum*). Todos los protocolos fueron aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València y los experimentos se realizaron de acuerdo con los reglamentos internacionales sobre la experimentación animal.

2. Preparación y montaje de los segmentos arteriales.

Tras el sacrificio de los ratones se procedió inmediatamente a la extracción de la aorta torácica y el mesenterio para los experimentos de reactividad vascular.

2.1. Aorta.

Se aisló la aorta torácica, desde el cayado hasta el diafragma, y se colocó en una placa Petri con solución fisiológica fría (NaCl 0,9%). La aorta torácica se limpió cuidadosamente de grasa y adherencias con ayuda de tijeras de microdissección, bajo una lupa (Wild M3C, Leica) iluminada con luz fría (EK-1, Euromex). Posteriormente se seccionó la aorta en anillos de aproximadamente 4 mm de longitud y se procedió a su montaje en el baño de órganos. El procedimiento para el registro isométrico consistió en introducir dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable (150 µm de diámetro) a través del anillo aórtico. Uno de los alambres quedó fijo a un soporte y el otro se sujetó a un transductor de tensión (FT 03, Grass Technologies). Los cambios de tensión isométrica se registraron

con la ayuda de un sistema de adquisición de datos PowerLab/8e (ADInstruments) conectado a un ordenador y utilizando el software Chart v 3.4/s (ADInstruments). Cada uno de los anillos se introdujo en un baño de órganos que contenía 5 ml de solución Krebs-Henseleit modificada compuesta (en mM) por: NaCl 115; KCl 4,6; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 2,5; NaHCO_3 25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01. Esta solución se burbujeó continuamente con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2), manteniendo el pH entre 7,3 -7,4, y la temperatura de la preparación a 37° C mediante un circuito de agua caliente (Figura 4).

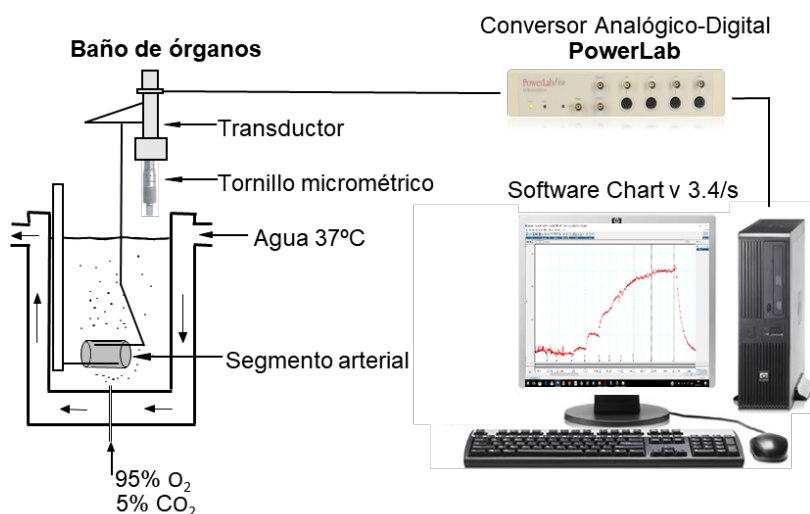


Figura 4. Esquema del baño de órganos, convertor analógico-digital y sistema de registro de la tensión isométrica.

2.2. Arteria mesentérica.

Una vez aislado el mesenterio se colocó en una placa Petri con una solución fría (NaCl 0,9%). Al igual que con la aorta, se limpió cuidadosamente de grasa y adherencias. Posteriormente se aislaron las arterias mesentéricas de segundo

orden y se seccionaron en anillos de 2 mm de longitud y se procedió a su montaje en el miógrafo (610M DMT - Danish Myo Technologies). Con la ayuda de las dos plataformas metálicas incluidas en el miógrafo se introdujeron dos alambres de tungsteno (40 μm de diámetro) por la luz del segmento arterial, uno de los alambres se fijó a un soporte móvil acoplado a un tornillo micrométrico que permite modificar el grado de estiramiento del vaso y el otro alambre se fijó a otro soporte acoplado a un transductor de tensión isométrica que registra los cambios de tensión producidos. El transductor se conectó a un sistema de adquisición de datos PowerLab/8e que con la ayuda del software Chart v 3.4/s registraba los cambios de tensión en un ordenador (**Figura 5**).

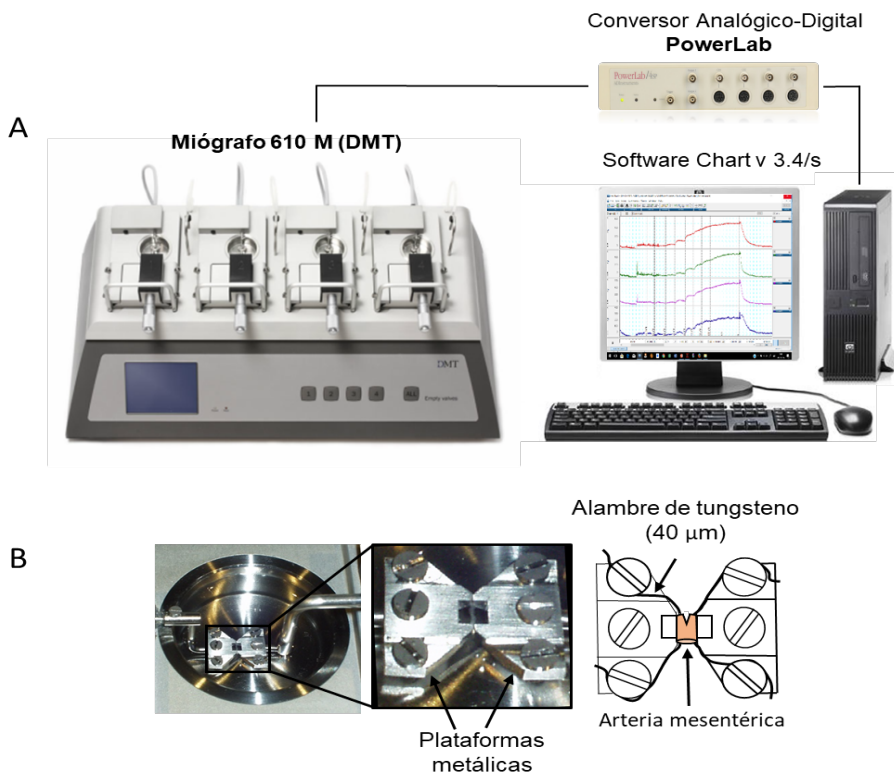


Figura 5. **A.** Fotografía de un miógrafo, convertor analógico-digital y sistema de registro de la tensión isométrica en segmentos de arteria mesentérica. **B.** Detalle de un pocillo y arteria mesentérica.

Tanto en el baño de órganos como en el miógrafo un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permite aplicar al anillo vascular la tensión pasiva adecuada separando los alambres y estirando las paredes vasculares.

3. Procedimiento experimental.

3.1. Determinación de la tensión basal óptima.

Antes de analizar la respuesta de los anillos arteriales a los diferentes estímulos, se determinó en experimentos preliminares la tensión pasiva óptima, que se define como la tensión basal a la que se produce la máxima respuesta a una solución despolarizante de cloruro potásico (KCl, 60 mM). Para ello, se determinó la respuesta contráctil al KCl (60 mM) a distintas tensiones basales que se fueron incrementando gradualmente hasta alcanzar la tensión basal a la que se obtiene la máxima contracción en respuesta al KCl. La tensión óptima de reposo determinada en estos experimentos para los segmentos aórticos fue de 1 g de fuerza (9,8 mN) y de 0,5 g de fuerza (4,9 mN) para los segmentos de arteria mesentérica.

Para aplicar la tensión pasiva óptima, se dispone de tornillo micrométrico que separa los alambres introducidos dentro del anillo vascular y que lo distiende. Puesto que la respuesta inmediata de los segmentos vasculares a la distensión es la relajación, la tensión se reajustó periódicamente hasta alcanzar una tensión estable. Durante este periodo de equilibrio la solución del baño se renovó cada 10-15 min.

3.2. Comprobación de la capacidad contráctil de los segmentos aórticos.

Tras el periodo de equilibrio, los segmentos aórticos se expusieron al KCl (60 mM), un agente despolarizante que induce contracción independiente de la activación de receptor por medio de la apertura de los canales de (Ca^{2+}) dependientes de voltaje, hasta que la contracción alcanza una meseta estable, aproximadamente a los 15-20 min. Esta prueba se realiza para comprobar la funcionalidad del músculo liso vascular. Aquellos segmentos que respondieron con una contracción menor a 4,5 mN, indicativa de un daño muscular, no se utilizaron para la realización de los experimentos.

La comprobación de la capacidad contráctil de los segmentos de arteria mesentérica presenta diferencias con respecto a la de la aorta, debido a que se requiere reactivar las propiedades mecánicas y funcionales del músculo liso antes de iniciar los experimentos. Los segmentos de arteria mesentérica una vez equilibrados son activados mediante la exposición al KCl (60 mM), que rápidamente alcanzan una contracción estable (3-5 min) pero poco intensa. Después de varios lavados con la solución Krebs-Henseleit modificada y tras llegar al equilibrio, nuevamente se añadió KCl (60 mM) más noradrenalina (10^{-5} M), alcanzando rápidamente (3-5 min) una contracción estable, indicativa de la máxima contracción que puede alcanzar el segmento vascular. Y finalmente, tras un último lavado, se exponen de nuevo los segmentos únicamente al KCl (60 mM), en esta tercera exposición al KCl se determina la capacidad contráctil del segmento vascular. Aquellos segmentos que respondieron con una contracción menor a 2 mN, indicativa de un daño muscular producido por el aislamiento o el montaje de los segmentos vasculares, no se utilizaron para la realización de los experimentos.

3.3. Comprobación de la presencia de endotelio.

La presencia de endotelio se determinó funcionalmente al añadir acetilcolina (10^{-7} - 10^{-4} M) a los anillos vasculares previamente contraídos con serotonina (5-HT, 10^{-5} M). Una relajación mayor al 70% en respuesta a la acetilcolina indica una adecuada función endotelial y confirma la integridad del endotelio (156).

Para determinar si las respuestas vasculares estudiadas dependían de la presencia de un endotelio funcional, en un grupo de experimentos se estudió los efectos de las distintas sustancias en segmentos vasculares que no tenían endotelio. La destrucción del endotelio se realizó de forma mecánica. En el caso de la aorta, se introdujo un alambre rugoso de acero inoxidable por la luz del vaso y con la ayuda de unas pinzas se desplazó el segmento aórtico longitudinal y transversalmente. La destrucción del endotelio de las ramas de arteria mesentérica se realizó introduciendo un pelo humano por la luz vascular y con la ayuda de unas pinzas desplazando el segmento longitudinal y transversalmente. La ausencia de respuesta relajante a la acetilcolina confirma la destrucción del endotelio (156).

4. Curvas concentración-respuesta al sorafenib.

Los efectos del sorafenib se determinaron en segmentos aórticos a tensión basal y en segmentos previamente contraídos con una concentración submáxima de KCl (40 mM) ó U46619 (3×10^{-8} M). A tensión basal o una vez alcanzada una contracción estable inducida por el agente vasoconstrictor se añadió sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) de forma acumulativa. El cambio de concentración se realizó cuando la concentración anterior había realizado su efecto máximo, aproximadamente a los 30 min.

4.1. Papel de la NOS en la respuesta relajante al sorafenib.

En segmentos de aorta con endotelio se valoró la participación del NO en la respuesta al sorafenib. Los segmentos se incubaron durante 15 min con L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor inespecífico de las NOS (157), se contrajeron con U46619 (3×10^{-8} M) y tras una contracción estable se realizó una curva concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

4.2. Papel de la COX en la respuesta relajante al sorafenib.

En segmentos de aorta con endotelio se valoró la participación de la COX en la respuesta al sorafenib. Los segmentos se incubaron durante 15 min con indometacina (10^{-5} M), un inhibidor inespecífico de las COX (158), se contrajeron con U46619 (3×10^{-8} M) y tras una contracción estable se realizó una curva concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

4.3. Papel del estrés oxidativo en la respuesta relajante al sorafenib.

En segmentos de aorta con endotelio se valoró la participación del O_2 en la respuesta al sorafenib. Los segmentos se incubaron durante 15 min con Tempol (10^{-3} M), un mimético de la superóxido dismutasa (SOD) (159), se contrajeron con U46619 (3×10^{-3} M) y tras una contracción estable se realizó una curva concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

4.4. Efecto del sorafenib sobre las curvas de concentración-respuesta al cloruro potásico.

La respuesta contráctil del músculo liso ante una despolarización directa se estudió mediante la realización de curvas concentración-respuesta al KCl (5-120 mM). Se añadió el KCl al baño de forma acumulativa y el cambio de concentración se llevó a cabo cuando la concentración anterior alcanzó su efecto

máximo. El papel de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L en la respuesta contráctil inducida por el KCl se determinó mediante la incubación durante 15 min de los segmentos aórticos con nifedipina (10^{-6} M), un bloqueante de los canales de Ca^{2+} tipo L (160), y posteriormente se realizó la curva concentración-respuesta al KCl. En otro grupo de experimentos se determinó el papel del Y-27632, un inhibidor de la ROK (161), en la contracción inducida por el KCl. Los efectos del sorafenib sobre la contracción inducida por el KCl se estudiaron en segmentos aórticos incubados durante 30 min con sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M).

4.5. Efecto del sorafenib sobre la concentración al cloruro cálcico.

Para determinar si el sorafenib es capaz de inhibir la contracción inducida por la entrada de Ca^{2+} extracelular, se preparó una solución Krebs-Henseleit sin Ca^{2+} y con EGTA 2 mM; esta solución se realizó de igual forma que la solución Krebs-Henseleit eliminando el CaCl_2 y el EDTA y añadiendo EGTA (2 mM). La sustitución del EDTA por el EGTA se debió a que el EDTA es un buen agente quelante de metales, con cierta afinidad por el Mg^{2+} pero poca por el Ca^{2+} , a diferencia del EGTA que tiene una mayor afinidad por el Ca^{2+} , asegurando la eliminación del mismo para la realización de los experimentos.

Los segmentos arteriales se lavaron cada 10 min durante 30 min con esta solución y posteriormente se lavaron con una solución despolarizante 60 mM de K^+ y sin Ca^{2+} , que se preparó reemplazando 60 mM de NaCl por 60 mM de KCl y eliminando el CaCl_2 y el EDTA de la solución Krebs-Henseleit. Este medio despolariza el músculo liso, pero no produce contracción por haber eliminado el Ca^{2+} del medio extracelular. En estas condiciones se estudió la respuesta contráctil del músculo liso ante una despolarización directa mediante la realización de curvas concentración-respuesta al CaCl_2 (10^{-5} - 3×10^{-2} M).

La participación de los canales de Ca^{2+} tipo L en la contracción inducida por la entrada de Ca^{2+} se estudió incubando durante 15 min los segmentos vasculares con nifedipina (10^{-6} M) y la participación de la ROK se estudió incubando con el Y-27632 (10^{-5} M), y posterior realización de las curvas concentración respuesta al CaCl_2 . Los efectos del sorafenib sobre la contracción inducida por la entrada de Ca^{2+} extracelular se estudió en segmentos arteriales en una solución despolarizante 60 mM de K^+ y sin Ca^{2+} incubados durante 30 min con sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} o 10^{-4} M) y posteriormente se realizaron las curvas concentración-respuesta al CaCl_2 .

4.6. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al U46619.

Para el estudio de la respuesta contráctil dependiente de receptor se realizaron curvas concentración-respuesta al U46619, un análogo estable del tromboxano A_2 que activa los receptores TP. Una vez alcanzada la tensión pasiva óptima en los segmentos aórticos, se les añadió de forma aditiva el U46619 (10^{-10} - 3×10^{-7} M). La contribución de la entrada de Ca^{2+} extracelular a la contracción inducida por la activación de los receptores TP se valoró mediante la incubación de los segmentos vasculares durante 15 min con nifedipina (10^{-6} M), un bloqueante de los canales de Ca^{2+} tipo L y posteriormente se realizaron las curvas concentración-respuesta al U46619. Por otra parte, también se estudió la contribución de la ROK en los efectos contráctiles del U46619 mediante la incubación durante 15 min con el Y-27632 (10^{-5} M) y posterior realización de las curvas al U46619.

En otro grupo de experimentos, se determinaron los efectos del sorafenib sobre la contracción inducida por el U46619, los segmentos aórticos se incubaron durante 30 min con una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M) y posteriormente se realizó la curva concentración-respuesta al U46619.

4.7. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la serotonina.

La serotonina es otro vasoconstrictor que induce sus efectos por activar receptores específicos en la pared vascular. Una vez alcanzada la tensión pasiva óptima en los segmentos vasculares, se les añadió de forma aditiva la serotonina (10^{-10} - 3×10^{-5} M).

En otro grupo de experimentos, los segmentos vasculares se incubaron durante 30 minutos con una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M) y posteriormente se realizó la curva concentración-respuesta a la serotonina.

4.8. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina.

El estímulo de los receptores adrenérgicos es un importante factor determinante del tono vascular. Para el estudio del efecto del sorafenib sobre el estímulo adrenérgico se realizaron curvas concentración-respuesta a la noradrenalina. La respuesta a la noradrenalina de los segmentos aórticos fue inconsistente y con una gran variabilidad entre los diferentes segmentos de aorta torácica de un mismo animal o entre los de diferentes animales, por lo que no se estudiaron los efectos del sorafenib en los anillos aórticos.

En los segmentos de arteria mesentérica, una vez alcanzada la tensión pasiva óptima, se les añadió de forma aditiva la noradrenalina (10^{-9} - 3×10^{-5} M). En otro grupo de experimentos, los segmentos mesentéricos se incubaron durante 30 min con una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M) y posteriormente se realizó la curva concentración-respuesta a la noradrenalina.

4.9. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina.

Se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en segmentos arteriales con o sin endotelio para revelar la relajación endotelio-dependiente. En segmentos con endotelio previamente contraídos con serotonina, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (control) o presencia de indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la COX, impidiendo la posible liberación de sustancias prostanoides de la pared vascular. El inhibidor se añadió 15 min antes del agonista contráctil.

En otro grupo de experimentos se comprobó la participación del NO en respuesta a la acetilcolina. Los segmentos se incubaron durante 15 min con L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la NOS (157), se contrajeron con serotonina y posteriormente se realizó la curva concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M).

Para estudiar la participación del EDHF, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en segmentos arteriales en presencia de indometacina y de L-NAME, para descartar la participación de prostanoides y de NO, y de charibdotoxina (ChTx, 10^{-7} M), un bloqueante de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) de intermedia ($K_{Ca3.1}$) (162) y alta conductancia ($K_{Ca1.1}$) (163), y apamina (10^{-6} M), un bloqueante de los K_{Ca} de baja conductancia (K_{Ca2}) (164). Los inhibidores y bloqueantes se añadieron al baño de órganos 15 min antes de la adición de la serotonina (10^{-5} M).

Para estudiar los efectos del sorafenib, los segmentos arteriales se incubaron durante 30 min con una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} ó 10^{-5} M), se contrajeron con serotonina (10^{-5} M) y una vez alcanzada una contracción estable se realizaron las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M).

4.10. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico.

El estudio de los efectos del sorafenib sobre la relajación independiente de la presencia de endotelio se realizó mediante la respuesta al nitroprusiato sódico, un vasodilatador que induce relajación por actuar directamente sobre el músculo liso vascular. Los segmentos vasculares se contrajeron previamente con serotonina (10^{-5} M) y después de obtener una contracción estable se añadió, a segmentos con y sin endotelio, nitroprusiato sódico (10^{-11} - 10^{-7} M).

En otro grupo de experimentos, los segmentos arteriales se incubaron durante 30 min con una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} ó 10^{-5} M), se contrajeron con serotonina y se realizaron las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico.

4.11. Efecto del sorafenib sobre la producción de anión superóxido en la pared vascular.

El estudio de los efectos del sorafenib sobre el estrés oxidativo basal o inducido en la pared vascular se realizó en la aorta torácica. Para ello se aisló la aorta torácica, aproximadamente 1-1,5 cm, que rápidamente se incluyó en Tissue-Tek OCT® (Sakura Finetek), con ayuda de un molde de silicona para el correcto encastramiento, que se mantuvo en un recipiente con hielo seco para su solidificación. Una vez desmoldados los bloques de Tissue-Tek OCT® se mantuvieron a una temperatura de -80° C hasta su utilización. Previamente a su montaje en el criotomo, los bloques se mantuvieron a una temperatura de -20° C durante una hora aproximadamente. Seguidamente se procedió, con ayuda del criotomo (Leica CM1900), a realizar cortes de la pared vascular de 10 μ m de espesor, que se colocaron sobre un portaobjetos para realizar el tratamiento correspondiente a cada muestra.

Los cortes se sumergieron en una solución salina fisiológica (PBS, Sigma-Aldrich) a una temperatura de 37° C durante 30 min, para mantener su hidratación y favorecer la activación y función de las enzimas del tejido. Seguidamente, se lavaron con 200 µL de PBS. Posteriormente se procedió a la incubación con los diferentes fármacos. Como control de las diversas situaciones experimentales, a un corte de pared vascular en vez de fármaco se le añadió un mismo volumen de PBS. La producción de O_2^- vascular se detectó *in situ* mediante la tinción con dihidroetidio (DHE, Molecular Probes), compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana celular, y una vez en el interior es oxidado por el O_2^- produciendo etidio, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia.

En un primer grupo de experimentos, los cortes se mantuvieron durante 15 min a 37° C, seguidamente se añadió DHE (2×10^{-6} M) recién preparado a todas las muestras y se incubaron durante 10 min. Posteriormente se procedió a aplicar U46619 (10^{-8} M), que induce la producción de O_2^- , y sirvió como control positivo, o una concentración de sorafenib (10^{-7} , 10^{-6} o 10^{-5} M). Además, un grupo de cortes se incubó con U46619 y sorafenib para estudiar una posible interacción entre los dos compuestos.

En otro grupo de experimentos para determinar que los cambios de fluorescencia eran debidos a la formación de O_2^- , los cortes se incubaron durante 15 min a 37° C con Tempol (10^{-3} M), un quelante de O_2^- , seguidamente se añadió DHE (2×10^{-6} M) durante 10 min y posteriormente se procedió a aplicar U46619 (10^{-8} M) o sorafenib.

Los cortes aórticos fueron visualizados a través de un microscopio de fluorescencia (Eclipse Ti-S, Nikon Co.) equipado con una cámara de vídeo digital (Digital Sight DS-Qi1MC, Nikon Co.). La cuantificación de la intensidad

de la fluorescencia emitida se calculó a partir de la medición de cinco áreas (20x) muestreadas por corte para cada condición experimental, usando el programa ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

5. Fármacos.

En el estudio se han usado los siguientes fármacos: apamina, charibdotoxina, cloruro potásico (KCl), cloruro de acetilcolina, clorhidrato de serotonina (5-HT), clorhidrato de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), cloruro cálcico (CaCl₂), 9,11-dideoxi-11 α ,9 α -epoximetanoprostaglandina F_{2 α} (U46619), dihidrato de nitroprusiato sódico, dihidrocloruro de *R*-(+)-*trans*-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridil) ciclohexanocarboxamida (Y-27632), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil (Tempol) y nifedipina que fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemical y el tosilato de sorafenib (**Figura 6**), que fue donado por Bayer (Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemania).

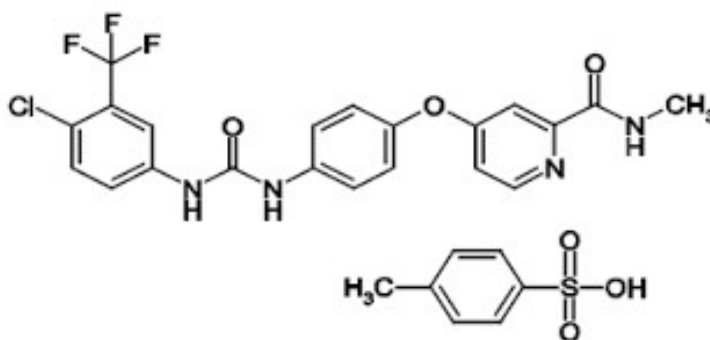


Figura 6. Estructura química del sorafenib (Nexavar®, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemania).

Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron con agua bidestilada excepto la indometacina, el U46619 y la nifedipina, que se disolvieron

inicialmente en etanol a una concentración 10^{-5} , 10^{-4} ó 10^{-3} M, respectivamente. El tosilato de sorafenib se disolvió inicialmente a una concentración de 10^{-1} M en dimetil sulfóxido (DMSO). La concentración final de etanol o DMSO en el baño fue inferior al 0,01%. Las posteriores diluciones se realizaron con solución salina fisiológica. Las diluciones de cada fármaco se preparan el día de experimento, y se mantienen en hielo durante todo el experimento.

6. Análisis estadístico de datos.

Todos los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media. La respuesta contráctil se expresa en valores absolutos (mN) y la vasorrelajación se expresa como porcentaje de relajación (%) de la contracción alcanzada con el fármaco vasoconstrictor. En cada grupo experimental, n indica el número de animales utilizados, de cada animal se obtuvieron cuatro segmentos aórticos. El pD_2 (logaritmo negativo de la concentración molar a la que se produce la mitad del efecto máximo) se determinó por análisis de regresión no lineal a partir de cada curva concentración-respuesta. El área bajo la curva (ABC) se calculó para cada una de las curvas concentración-respuesta y se expresó en unidades arbitrarias (U.A.). Las diferencias entre las distintas condiciones experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y posteriormente se realizó el test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor de $P < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático Prism 4® (GraphPad Software Inc.).

Resultados

1. Aorta.

1.1. Curvas concentración–respuesta al sorafenib.

La adición de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) a tensión basal no produjo ningún cambio en el registro de la tensión. En anillos previamente contraídos con KCl (40 mM), y tras alcanzar una contracción estable, el sorafenib indujo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $65,1 \pm 5,1\%$ y una CE_{50} de $5,92 \times 10^{-6}$ M (**Figura 7, Tabla 1**). Cuando los segmentos aórticos se contrajeron con U46619 (10^{-8} M), el sorafenib produjo relajación con un efecto máximo del $93,3 \pm 5,0\%$ y una CE_{50} de $1,74 \times 10^{-6}$ M (**Figura 7, Tabla 1**). Los segmentos aórticos fueron aproximadamente 3,4 veces más sensibles a los efectos vasorrelajantes al sorafenib cuando se contrajeron con U46619 y la relajación máxima un 30% mayor.

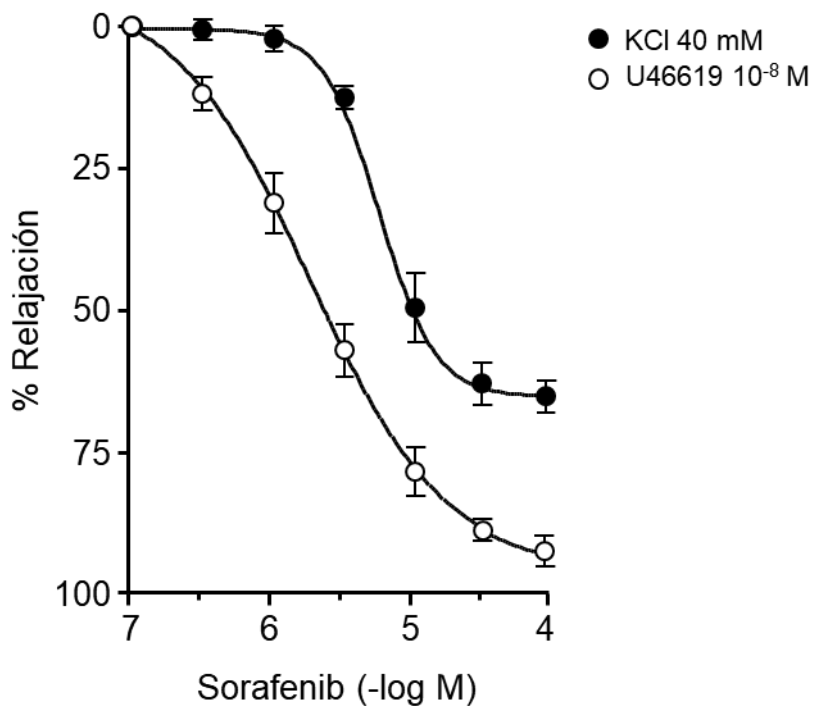


Figura 7. Curvas concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) en anillos aórticos contraídos con KCl (40 mM) ó U46619 (10^{-8} M).

Tabla 1. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al sorafenib en segmentos de aorta previamente contraídos con KCl (40 mM) ó U46619 (10^{-8} M).

Sorafenib	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
KCl	8	$5,23 \pm 0,06$	$65,1 \pm 5,1$
U46619	8	$5,76 \pm 0,10$	$93,3 \pm 5,0^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con KCl.

La contribución de los factores endoteliales y del O_2^- en la relajación inducida por el sorafenib se estudió en anillos con endotelio contraídos con U46619 (10^{-8} M). Cuando los segmentos aórticos se incubaron con L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la NOS, el sorafenib produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $96,2 \pm 2,1\%$ y una CE_{50} de $2,60 \times 10^{-6}$ M (**Figura 8, Tabla 2**). Los segmentos aórticos no experimentaron diferencias significativas en los efectos vasodilatadores del sorafenib en ausencia y en presencia de L-NAME, descartando al NO como mediador de la respuesta relajante inducida por el sorafenib.

En presencia de indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la COX, el sorafenib produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $93,6 \pm 6,2\%$ y una CE_{50} de $1,26 \times 10^{-6}$ M (**Figura 9, Tabla 2**). La relajación al sorafenib fue similar en ausencia y en presencia de indometacina, descartando la participación de prostaglandinas relajantes en el efecto vasodilatador inducido por el sorafenib.

En segmentos tratados con Tempol (10^{-3} M), un quelante del O_2^- , y contraídos con U46619 (10^{-8} M), el sorafenib produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $97,1 \pm 2,0\%$ y una CE_{50} de $1,15 \times 10^{-6}$ M (**Figura 10, Tabla 2**). Los efectos relajantes del sorafenib fueron similares ($P > 0,05$) en anillos en ausencia y en presencia de Tempol (**Figura 10, Tabla 2**), descartando al O_2^- en los efectos relajantes mediados por el sorafenib.

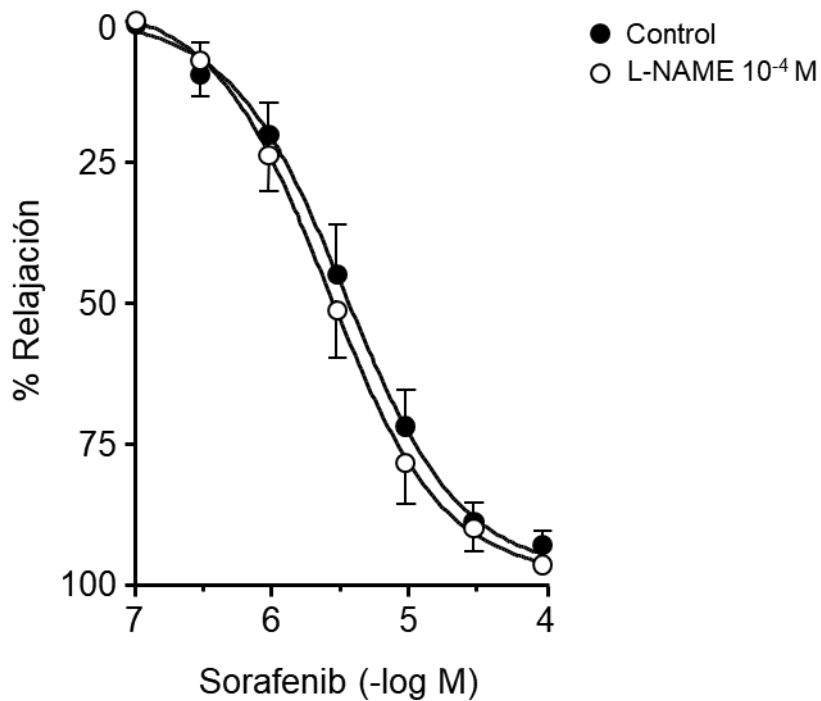


Figura 8. Curvas concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) en anillos aórticos contraídos con U46619 (10^{-8} M) en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M).

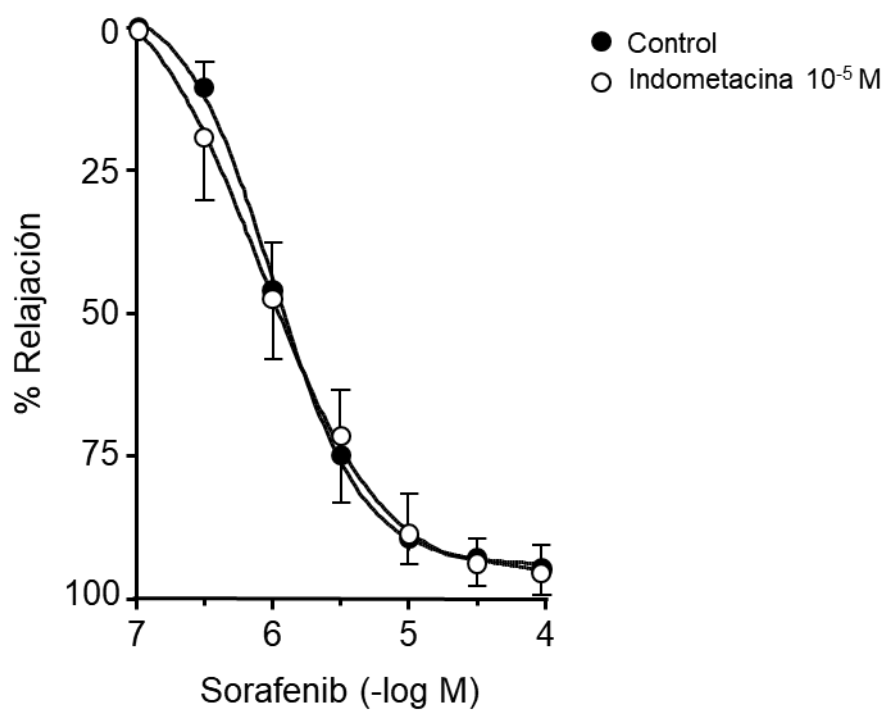


Figura 9. Curvas concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) en anillos aórticos contraídos con U46619 (10^{-8} M) en ausencia (Control) y en presencia de indometacina (10^{-5} M).

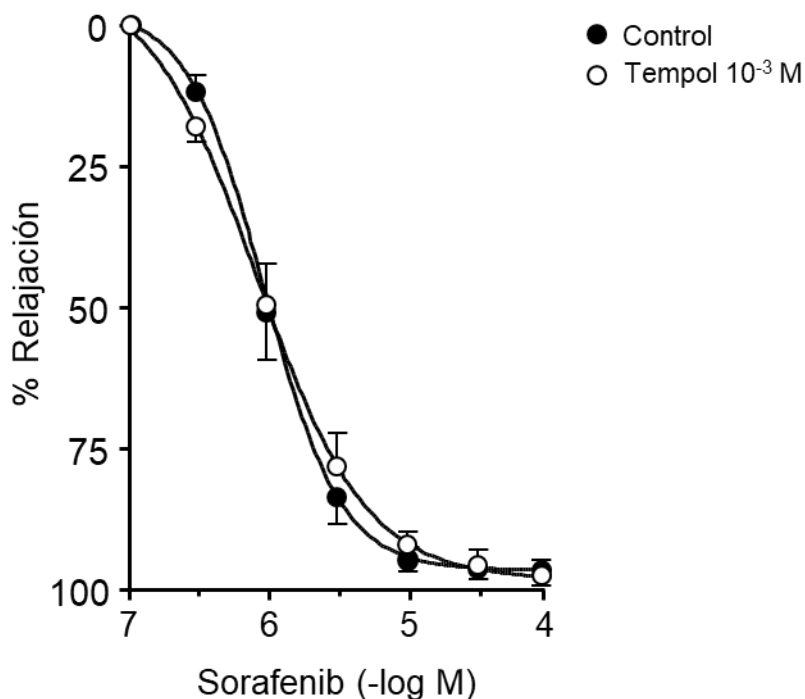


Figura 10. Curvas concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) en anillos aórticos contraídos con U46619 (10^{-8} M) en ausencia (Control) y presencia de Tempol (10^{-3} M).

Tabla 2. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al sorafenib en segmentos de aorta previamente contraídos con U46619 (10^{-8} M) en ausencia (Control) y en presencia de L-NAME (10^{-4} M), indometacina (10^{-5} M) ó Tempol (10^{-3} M).

Sorafenib	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	8	$5,76 \pm 0,10$	$93,3 \pm 5,0$
L-NAME 10^{-4} M	8	$5,59 \pm 0,12$	$96,2 \pm 2,1$
Indometacina 10^{-5} M	8	$5,90 \pm 0,20$	$93,6 \pm 6,2$
Tempol 10^{-3} M	8	$5,94 \pm 0,11$	$97,1 \pm 2,0$

n = número de ratones.

1.2. Efectos del sorafenib sobre las curvas concentración–respuesta al KCl.

El KCl produjo contracción dependiente de la concentración con una contracción máxima de $7,9 \pm 0,1$ mN y una CE_{50} de $3,09 \times 10^{-2}$ M (**Figura 11**). Para estudiar el papel de los canales de Ca^{2+} tipo L en la contracción inducida por el KCl, los segmentos arteriales se incubaron con nifedipina (10^{-6} M), un bloqueante específico de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. En presencia de nifedipina la CE_{50} fue de $5,31 \times 10^{-3}$ M y la contracción máxima de $1,3 \pm 0,1$ mN, disminuyendo ($P < 0,05$) la sensibilidad al KCl en términos de CE_{50} y la contracción máxima, aproximadamente un 84%, respecto a las condiciones control (**Figura 11**).

El papel de la ROK en la contracción inducida por el KCl se determinó incubando los segmentos aórticos con Y-27632 (10^{-5} M). El Y-27632 disminuyó significativamente la CE_{50} ($4,00 \times 10^{-2}$ M *versus* Control $3,09 \times 10^{-2}$ M, $P < 0,05$) y la contracción máxima inducida por el KCl ($2,63 \pm 0,1$ mN *versus* control $7,9 \pm 0,1$ mN, $P < 0,05$) aproximadamente un 67% (**Figura 11**).

La incubación con sorafenib 10^{-7} M no modificó significativamente la respuesta contráctil de los segmentos aórticos al KCl (**Figura 12, Tabla 3**). El incremento de la concentración de sorafenib a 10^{-6} y 10^{-5} M no modificó significativamente la pD_2 de las curvas concentración respuesta al KCl, pero disminuyó ($P < 0,05$) el efecto máximo un 36,7% y un 57,0%, respectivamente. La incubación con sorafenib 10^{-4} M disminuyó significativamente tanto la pD_2 como el efecto máximo aproximadamente un 75,9% (**Figura 12, Tabla 3**).

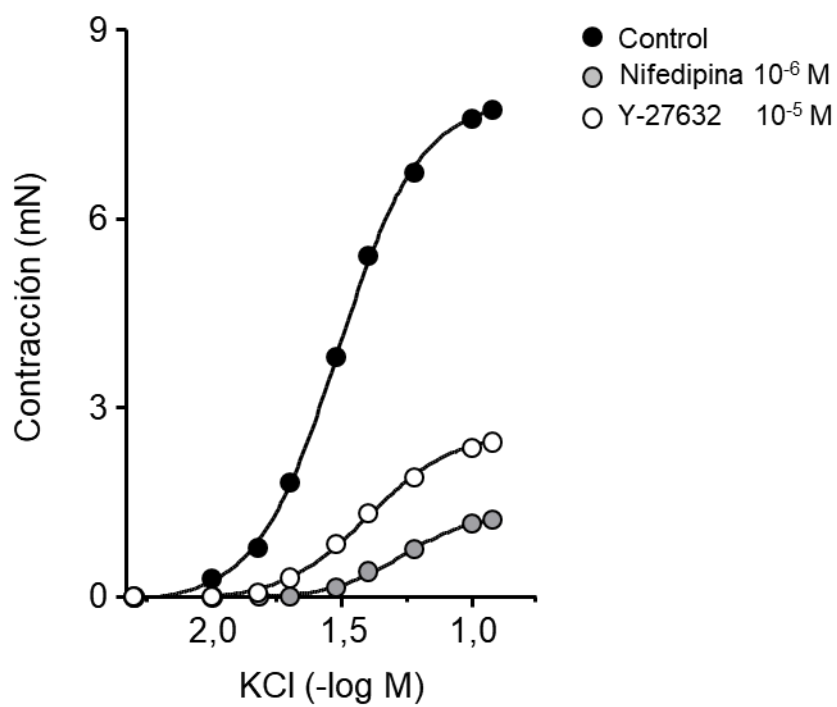


Figura 11. Curvas concentración-respuesta al KCl (5 – 120 mM) en segmentos aórticos en ausencia (Control) y en presencia de nifedipina ($10^{-6} M$) ó Y-27632 ($10^{-5} M$).

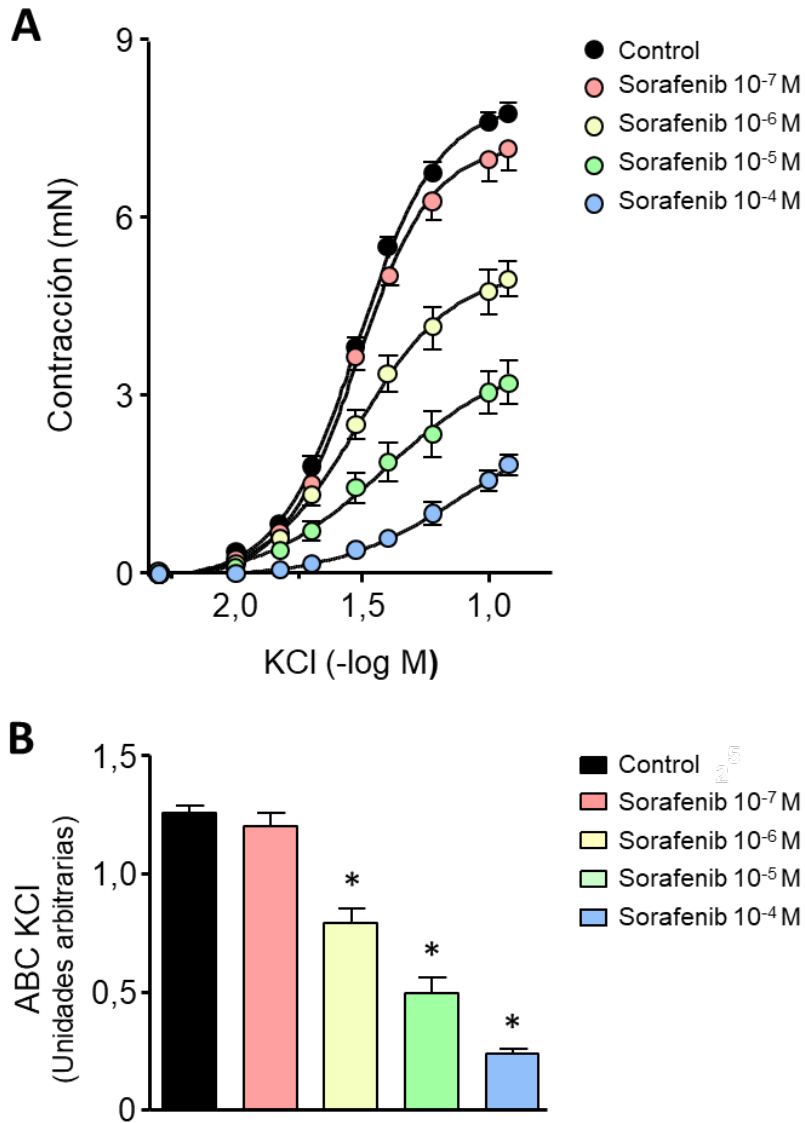


Figura 12. **A.** Curvas concentración-respuesta al KCl (5 - 120 mM) y **B.** área bajo la curva (ABC) de las curvas concentración-respuesta al KCl en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 3. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al KCl en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

KCl	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$1,51 \pm 0,01$	$7,9 \pm 0,1$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$1,52 \pm 0,01$	$7,1 \pm 0,3$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$1,50 \pm 0,02$	$5,0 \pm 0,2^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$1,42 \pm 0,05$	$3,4 \pm 0,3^*$
Sorafenib 10^{-4} M	8	$1,24 \pm 0,03^*$	$1,9 \pm 0,1^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

1.3. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al cloruro de calcio.

El $CaCl_2$ indujo contracción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $8,2 \pm 0,4$ mN y una CE_{50} de $6,61 \times 10^{-4}$ M (**Figura 13**). La incubación con nifedipina (10^{-6} M) inhibió totalmente la contracción inducida por el $CaCl_2$, indicando que la contracción del músculo liso vascular inducida por el $CaCl_2$ se produce por la entrada de Ca^{2+} al interior celular a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas (**Figura 13**).

La incubación con Y-27632 (10^{-5} M) aumentó la CE_{50} al $CaCl_2$ ($4,61 \times 10^{-3}$ M *versus* Control $6,61 \times 10^{-4}$ M, $P < 0,05$) y disminuyó la contracción máxima ($2,5 \pm 0,4$ mN *versus* Control $8,2 \pm 0,4$ mN, $P < 0,05$) (**Figura 13**). Los resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} al interior celular induce la activación de la ROK e incrementa la contracción del músculo liso vascular.

La incubación de los segmentos aórticos con sorafenib 10^{-7} M no modificó de manera significativa la respuesta contráctil al $CaCl_2$ (**Figura 14, Tabla 4**). La

incubación con sorafenib a una concentración de 10^{-6} , 10^{-5} ó 10^{-4} M no modificó la CE_{50} ($P < 0,05$), pero disminuyó el efecto máximo al $CaCl_2$ a $5,1 \pm 0,1$ mN, $3,9 \pm 0,3$ mN y $0,7 \pm 0,5$ mN, respectivamente (**Figura 14, Tabla 4**). Inhibiendo un 37,8%, 52,4% y 91,5% la contracción máxima al $CaCl_2$ en condiciones control.

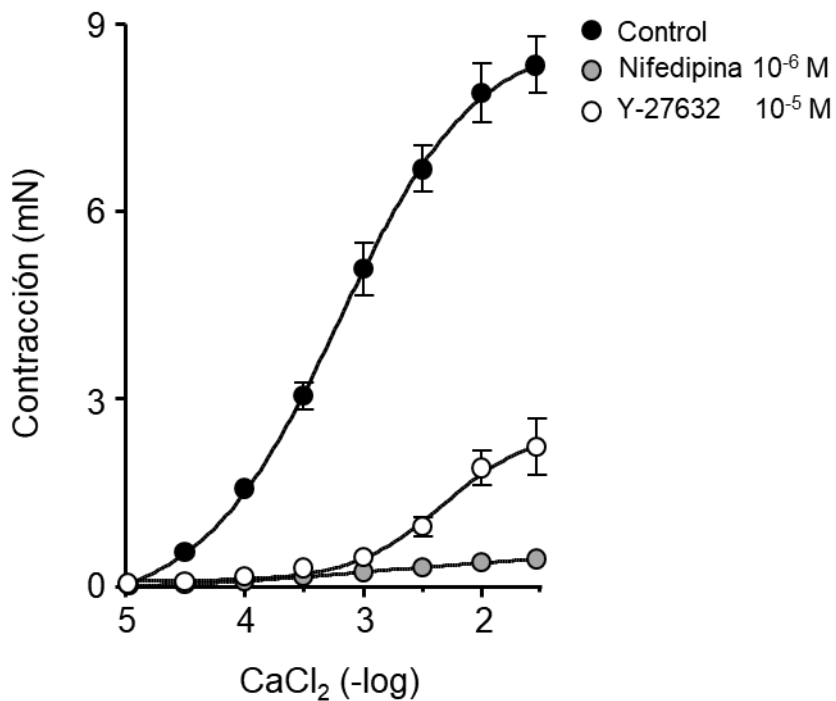


Figura 13. Curvas concentración-respuesta al $CaCl_2$ (10^{-5} - 3×10^{-2} M) en segmentos aórticos en ausencia (Control) y en presencia de nifedipina (10^{-6} M) ó Y-27632 (10^{-5} M).

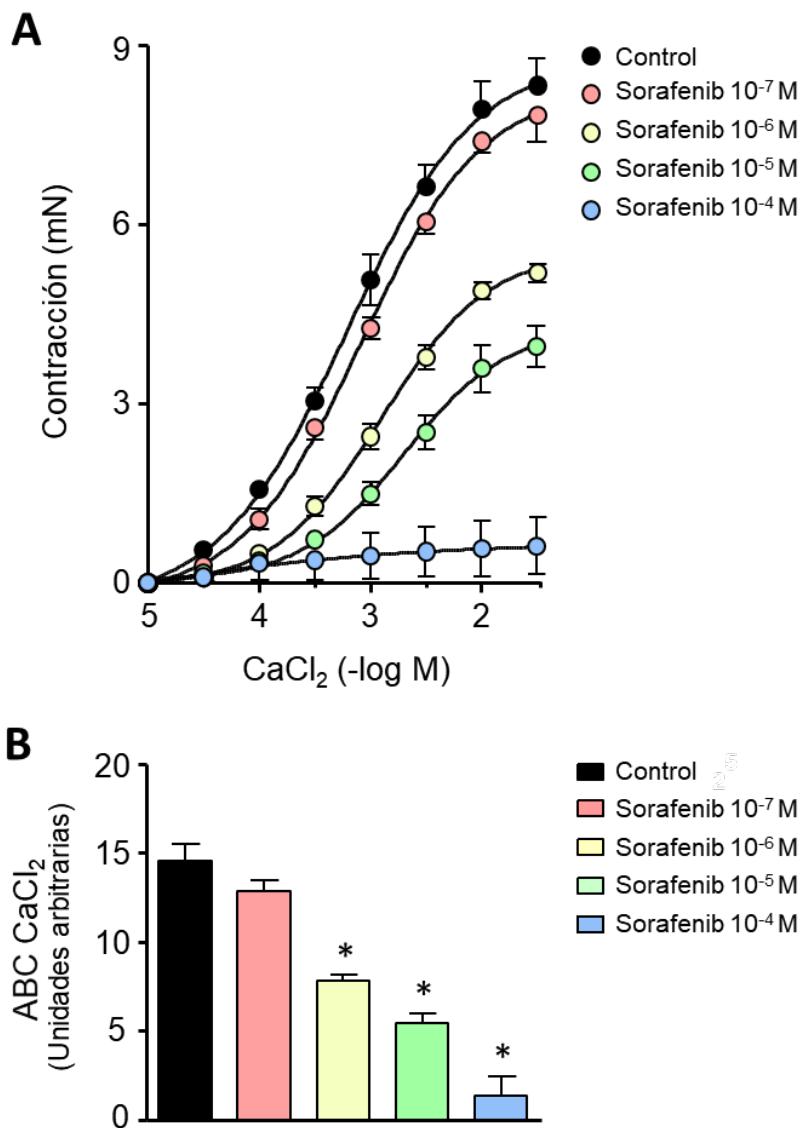


Figura 14. A. Curvas concentración-respuesta al CaCl₂ (10⁻⁵ - 3x10⁻² M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas al CaCl₂ en segmentos de aorta de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10⁻⁷ -10⁻⁴ M). **P* < 0,05 comparado con el Control.

Tabla 4. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (Emax) de las curvas concentración-respuesta al $CaCl_2$ en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

CaCl ₂	n	pD ₂	Emax (mN)
Control	7	3,18 ± 0,03	8,2 ± 0,4
Sorafenib 10 ⁻⁷ M	8	3,09 ± 0,01	7,8 ± 0,4
Sorafenib 10 ⁻⁶ M	8	2,90 ± 0,07	5,1 ± 0,1*
Sorafenib 10 ⁻⁵ M	8	2,70 ± 0,09	3,9 ± 0,3*
Sorafenib 10 ⁻⁴ M	8	#	0,7 ± 0,5*

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

la pD_2 no se calculó al no alcanzar el $CaCl_2$ una contracción máxima mayor del 15% de la contracción máxima control.

1.4. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al U46619.

El U46619 (10^{-10} - 10^{-6} M) indujo contracción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $16,4 \pm 0,6$ mN y una CE_{50} de $3,51 \times 10^{-8}$ M (**Figura 15**). La incubación con nifedipina no modificó la respuesta contráctil al U46619 en términos de CE_{50} ($2,59 \times 10^{-8}$ M *versus* Control $3,51 \times 10^{-8}$ M, $P > 0,05$) ni el efecto máximo ($14,4 \pm 0,4$ mN *versus* Control $16,4 \pm 0,6$ mN, $P > 0,05$). La incubación con Y-27632 (10^{-5} M) disminuyó la contracción inducida por el U46619, disminuyendo la contracción máxima ($6,1 \pm 0,9$ mN *versus* Control $16,4 \pm 0,6$ mN, $P < 0,05$) y aumentó la CE_{50} ($8,43 \times 10^{-8}$ M *versus* Control $3,51 \times 10^{-8}$ M, $P < 0,05$) (**Figura 15**). Estos resultados indican que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L no participan en el mecanismo de contracción al U46619, sin embargo, el estímulo de los receptores TP por el U46619 activaría la ROK para incrementar y mantener la contracción del músculo liso vascular.

La incubación de los segmentos aórticos con sorafenib a 10^{-7} M durante un periodo de 30 min no modificó significativamente la respuesta contráctil al U46619 (**Figura 16, Tabla 5**). La incubación con sorafenib 10^{-6} M no modificó ($P > 0,05$) la CE_{50} , pero disminuyó significativamente el efecto máximo al U46619 (**Figura 16, Tabla 5**). La incubación con concentraciones mayores de sorafenib 10^{-5} y 10^{-4} M incrementó significativamente la CE_{50} de las curvas al U46619 y disminuyó la contracción máxima, aproximadamente un 65,3% y un 78,7%, respectivamente (**Figura 16, Tabla 5**).

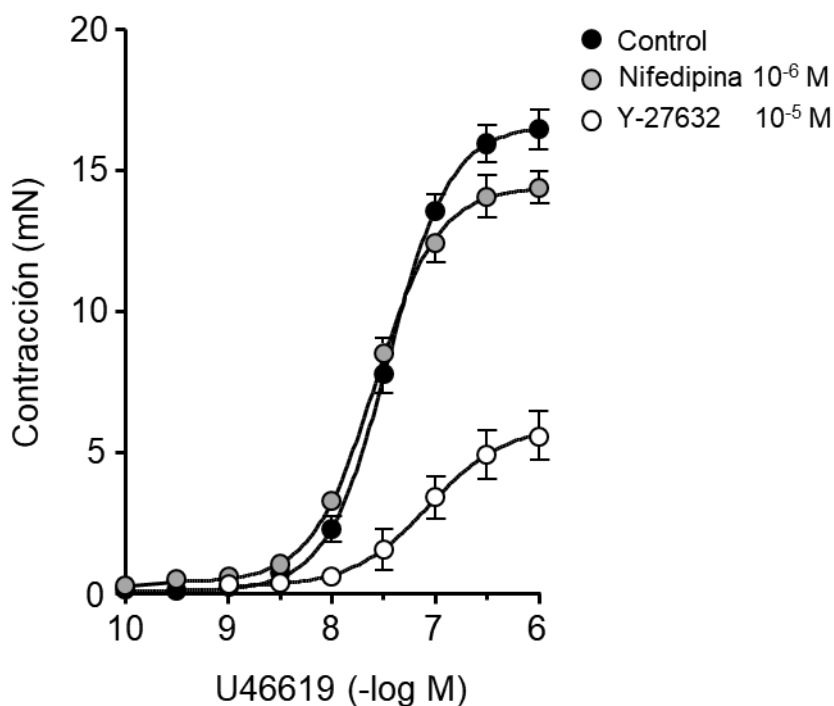


Figura 15. Curvas concentración-respuesta al U46619 (10^{-10} - 10^{-6} M) en aorta de ratón en ausencia (Control) y en presencia de nifedipina (10^{-6} M) ó Y-27632 (10^{-5} M).

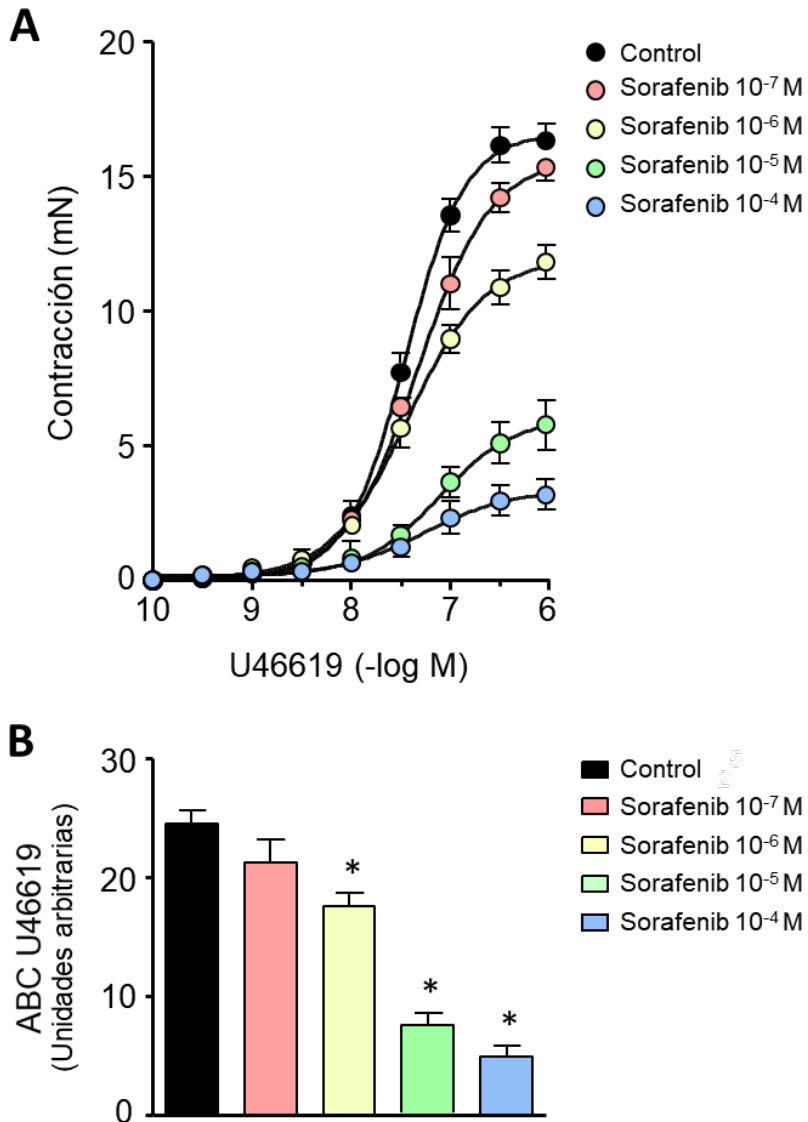


Figura 16. A. Curvas concentración-respuesta al U46619 (10^{-10} - 10^{-6} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas al U46619 en segmentos de aorta de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 5. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al U46619 en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

U46619	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$7,49 \pm 0,04$	$16,4 \pm 0,6$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$7,38 \pm 0,07$	$15,4 \pm 0,5$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$7,45 \pm 0,06$	$11,8 \pm 0,7^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$7,11 \pm 0,08^*$	$5,7 \pm 0,9^*$
Sorafenib 10^{-4} M	8	$7,15 \pm 0,15^*$	$3,5 \pm 0,4^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

1.5. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la serotonina.

La serotonina (10^{-8} - 3×10^{-4} M) indujo contracción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $9,4 \pm 0,2$ mN y una CE_{50} de $7,41 \times 10^{-7}$ M (**Figura 17, Tabla 6**). La incubación de los segmentos aórticos con sorafenib 10^{-7} M no modificó de manera significativa la contracción a la serotonina (**Figura 17, Tabla 6**). La incubación con concentraciones mayores de sorafenib, 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M, incrementó ($P < 0,05$) la CE_{50} y disminuyó ($P < 0,05$) el efecto máximo de la serotonina un 39,4%, 58,5% y 79,8%, respectivamente (**Figura 17, Tabla 6**).

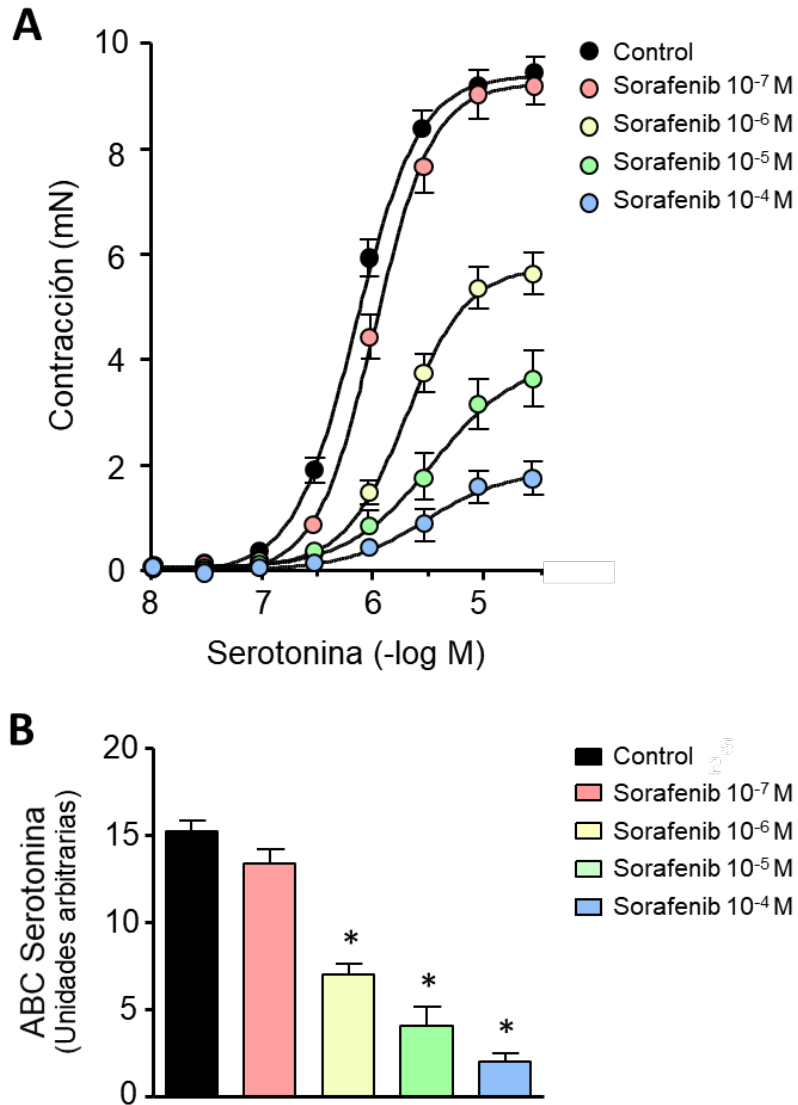


Figura 17. A. Curvas concentración-respuesta a la serotonina (10^{-8} - 3×10^{-5} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas a la serotonina en segmentos de aorta de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 6. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la serotonina en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M).

Serotonina	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$6,13 \pm 0,03$	$9,4 \pm 0,2$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$5,96 \pm 0,04$	$9,2 \pm 0,3$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$5,68 \pm 0,06^*$	$5,7 \pm 0,3^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$5,43 \pm 0,11^*$	$3,9 \pm 0,9^*$
Sorafenib 10^{-4} M	8	$5,40 \pm 0,12^*$	$1,9 \pm 0,2^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

1.6. Efectos del sorafenib sobre la curva concentración-respuesta a la acetilcolina.

En segmentos aórticos con endotelio la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) produjo vasorrelajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $97,2 \pm 1,1\%$ y una CE_{50} de $1,26 \times 10^{-8}$ M (**Figura 18**). En segmentos aórticos sin endotelio la acetilcolina no produjo relajación. En segmentos aórticos con endotelio la incubación con L-NAME (10^{-4} M) inhibió completamente la respuesta relajante a la acetilcolina (**Figura 18**), indicando que la relajación inducida por la acetilcolina está mediada por el NO de origen endotelial.

La incubación con sorafenib 10^{-7} ó 10^{-6} M no modificó ($P > 0,05$) la relajación a la acetilcolina (**Figura 19 y Tabla 7**). La incubación con sorafenib 10^{-5} M incrementó significativamente la CE_{50} , desplazando la curva concentración-respuesta a la derecha 4,1 veces e inhibió aproximadamente un 24,9% la relajación máxima a la acetilcolina (**Figura 19, Tabla 7**). Estos resultados indican que el sorafenib a altas concentraciones pueden inhibir la relajación dependiente del endotelio mediada por NO.

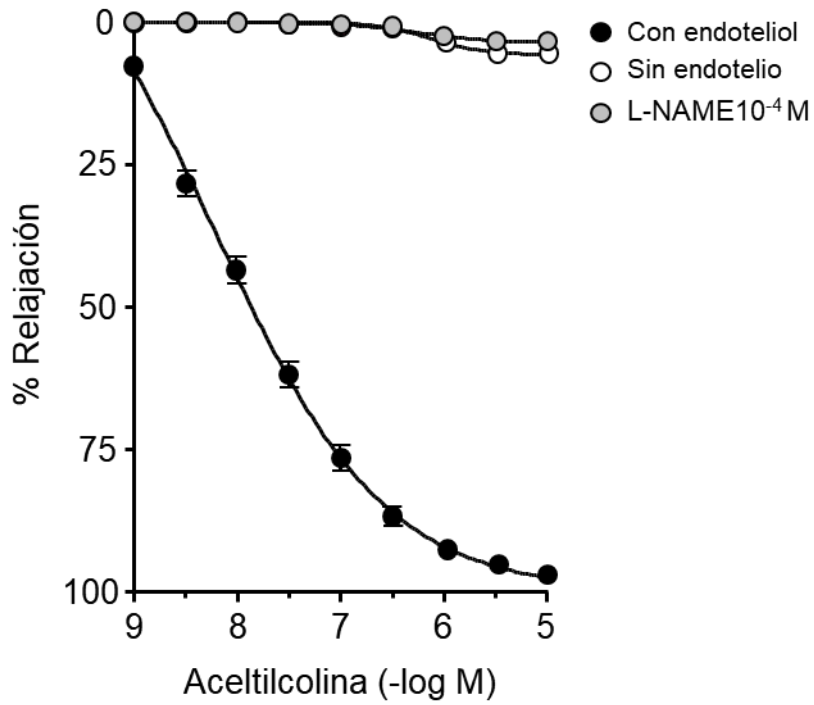


Figura 18. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos aórticos contraídos con serotonina (10^{-5} M) en segmentos con endotelio, sin endotelio ó con endotelio en presencia de L-NAME (10^{-4} M).

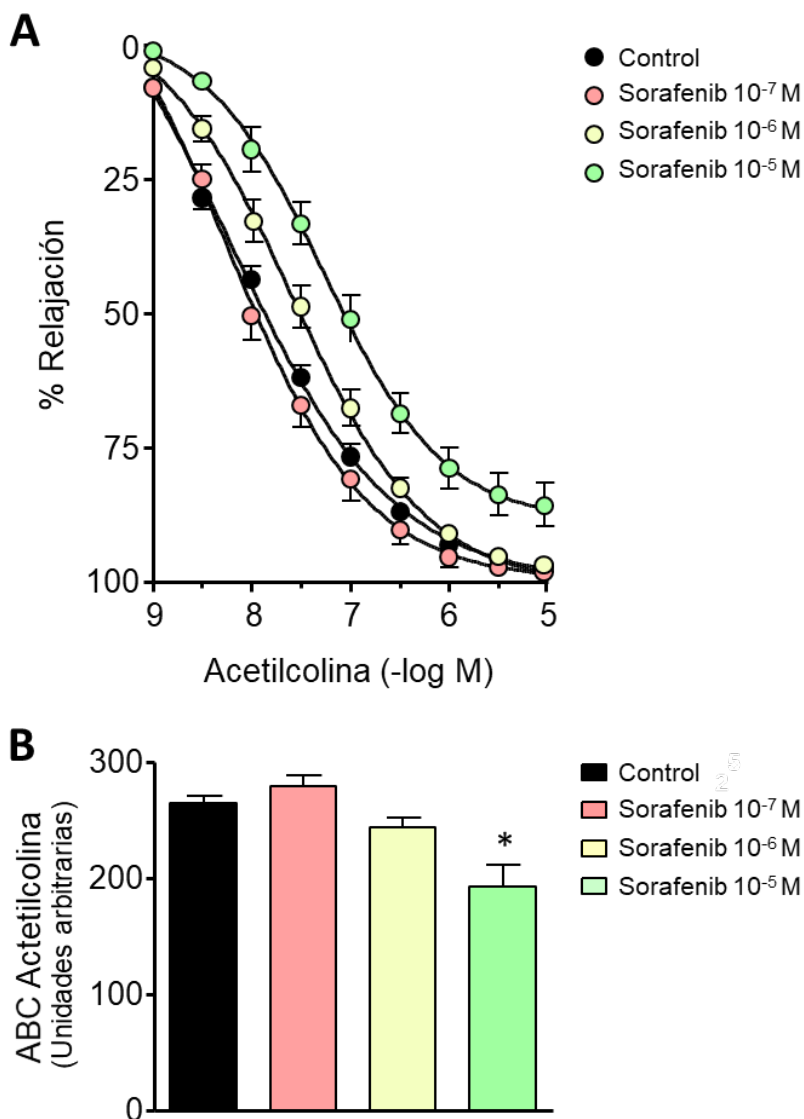


Figura 19. A. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas a la acetilcolina en segmentos aórticos con endotelio previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M) en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 7. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Acetilcolina	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	7	$7,94 \pm 1,0$	$97,2 \pm 1,1$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$7,99 \pm 0,1$	$97,9 \pm 1,2$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$7,62 \pm 0,1$	$97,1 \pm 0,8$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$7,33 \pm 0,2^*$	$85,4 \pm 5,7^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

1.7. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (NP).

En segmentos con endotelio el nitroprusiato (10^{-11} - 10^{-7} M) produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del 100% y una CE_{50} de $1,08 \times 10^{-10}$ M (**Figura 20**). La eliminación del endotelio no modificó la CE_{50} ($1,01 \times 10^{-10}$ *versus* con endotelio $1,08 \times 10^{-10}$ M, $P > 0,05$) ni la relajación máxima inducida por el nitroprusiato (**Figura 20**), demostrando que el nitroprusiato induce relajación por actuar directamente sobre el músculo liso vascular.

La incubación con sorafenib 10^{-7} , 10^{-6} ó 10^{-5} M no modificó ($P > 0,05$) ni la CE_{50} ni la relajación máxima de las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (**Figura 21, Tabla 8**), indicando que el sorafenib no interfiere en el mecanismo de relajación del músculo liso una vez el NO ha sido sintetizado.

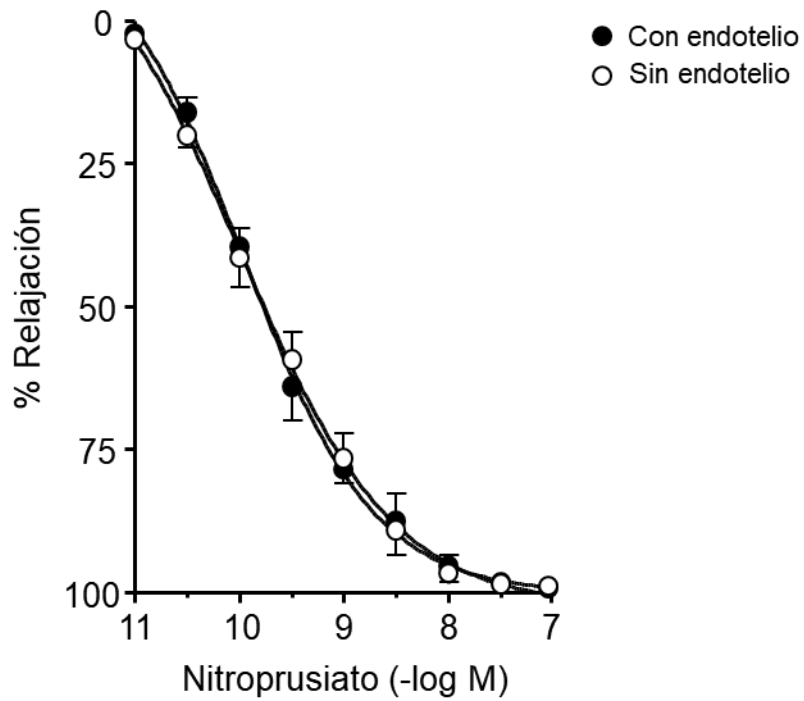


Figura 20. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (10^{-11} - 10^{-7} M) en segmentos aórticos con o sin endotelio previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M).

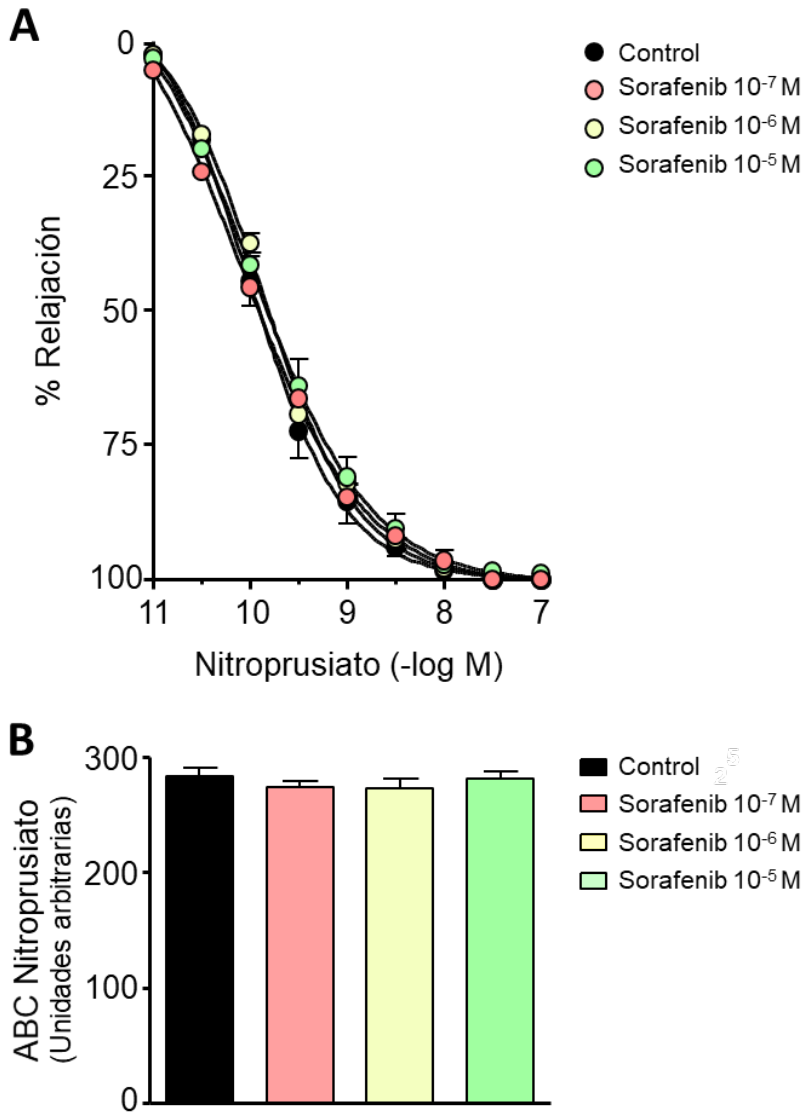


Figura 21. **A.** Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (10^{-11} - 10^{-7} M) y **B.** área bajo la curva (ABC) de las curvas al nitroprusiato en segmentos aórticos previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M) en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Tabla 8. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Nitroprusiato	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	7	$9,96 \pm 0,38$	100
Sorafenib 10^{-7} M	8	$9,89 \pm 0,22$	100
Sorafenib 10^{-6} M	8	$9,97 \pm 0,94$	100
Sorafenib 10^{-5} M	8	$9,94 \pm 0,87$	100

n = número de ratones.

2. Arterias mesentéricas.

2.1. Curvas concentración–respuesta al sorafenib.

La adición de sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) a segmentos de arteria mesentérica a tensión basal no produjo ningún cambio en el registro de la tensión. En anillos previamente contraídos con KCl 40 mM el sorafenib indujo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $91,0 \pm 3,1\%$ y una CE_{50} de $3,25 \times 10^{-6}$ M (**Figura 22, Tabla 9**). Cuando los segmentos aórticos se contrajeron con U46619 (10^{-8} M), el sorafenib produjo relajación vascular dependiente de la concentración con un efecto máximo del 100% y una CE_{50} de $1,05 \times 10^{-6}$ M (**Figura 22, Tabla 9**). Los segmentos aórticos fueron aproximadamente 3,1 veces más sensibles a los efectos vasodilatadores del sorafenib cuando se contrajeron con U46619 (10^{-8} M).

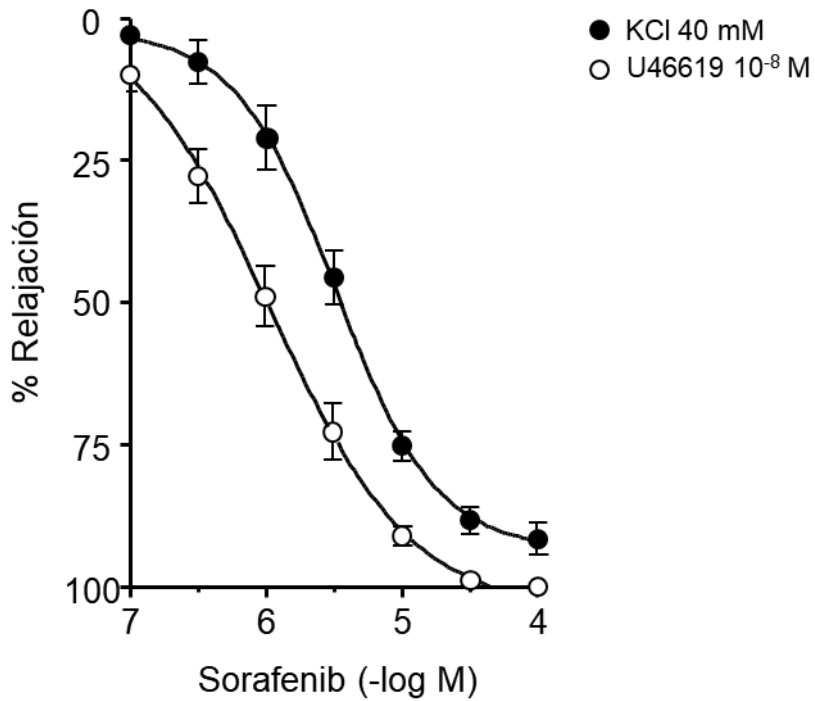


Figura 22. Curvas concentración-respuesta al sorafenib (10^{-7} - 10^{-4} M) en segmentos de arteria mesentérica contraídos con KCl (40 mM) ó U46619 (10^{-8} M).

Tabla 9. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al sorafenib en segmentos de arteria mesentérica previamente contraídos con KCl (40 mM) o U46619 (10^{-8} M).

Sorafenib	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
KCl	8	$5,49 \pm 0,07$	$91,0 \pm 3,1$
U46619	8	$5,99 \pm 0,12$	100*

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con KCl.

2.2. Efectos del sorafenib sobre las curvas concentración–respuesta al KCl.

El KCl produjo contracción dependiente de la concentración en segmentos de arteria mesentérica con un efecto máximo de $4,2 \pm 0,2$ mN y una CE_{50} de $3,02 \times 10^{-2}$ M (**Figura 23, Tabla 10**). La incubación con sorafenib 10^{-7} M no modificó significativamente la respuesta contráctil al KCl. La incubación con concentraciones mayores de sorafenib, 10^{-6} y 10^{-5} M no modificó significativamente la CE_{50} de las curvas concentración-respuesta al KCl pero disminuyó ($P < 0,05$) el efecto máximo un 54,8% y un 85,7%, respectivamente (**Figura 23, Tabla 10**).

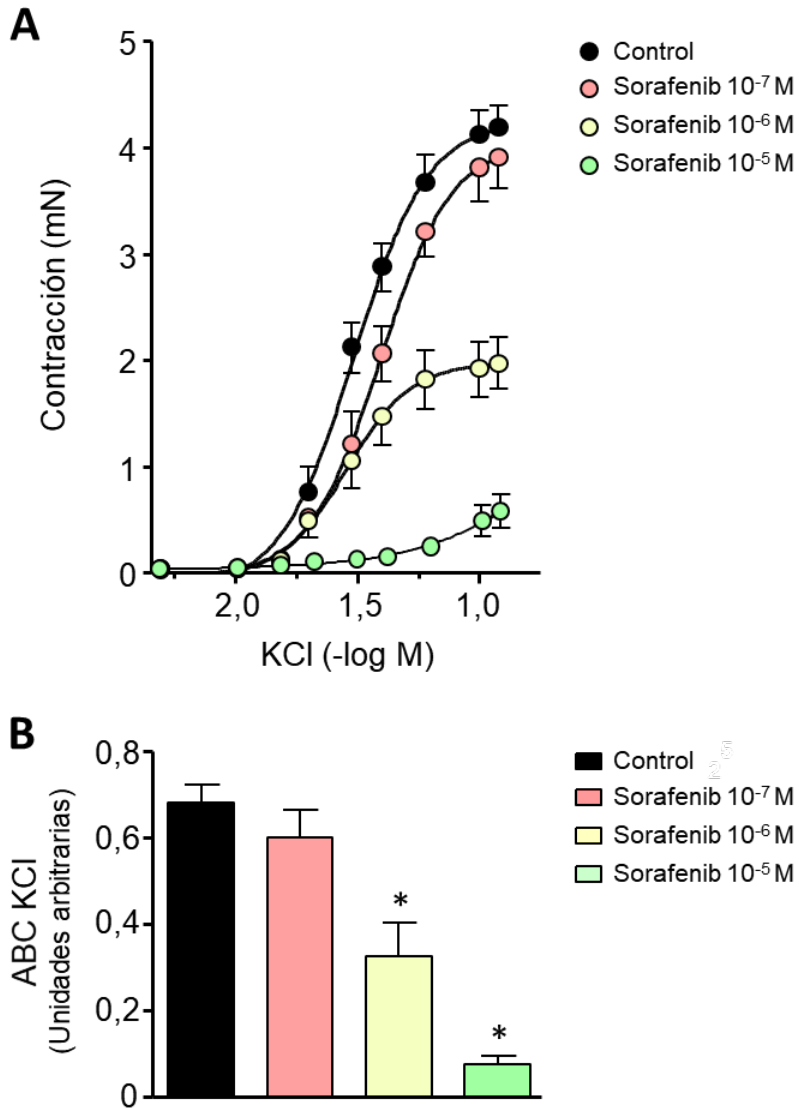


Figura 23. A. Curvas concentración-respuesta al KCl (5 – 120 mM) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas al KCl en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10⁻⁷ - 10⁻⁵ M). **P* < 0,05 comparado con el Control.

Tabla 10. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (Emax) de las curvas concentración-respuesta al KCl en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

KCl	<i>n</i>	pD_2	Emax (mN)
Control	7	$1,52 \pm 0,01$	$4,2 \pm 0,2$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$1,41 \pm 0,01$	$3,9 \pm 0,6$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$1,52 \pm 0,03$	$1,9 \pm 0,5^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	#	$0,6 \pm 0,2^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

la pD_2 no se calculó al no alcanzar el KCl una contracción máxima mayor del 15% de la contracción máxima control.

2.3. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración–respuesta al U46619.

En la arteria mesentérica el U46619 (10^{-10} – 3×10^{-7} M) indujo contracción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $5,6 \pm 0,4$ mN y una CE_{50} de $3,08 \times 10^{-8}$ M (**Figura 24, Tabla 11**). La incubación de los segmentos aórticos con sorafenib 10^{-7} M no modificó ($P > 0,05$) la contracción al U46619. La incubación con sorafenib 10^{-6} ó 10^{-5} M no modificó significativamente la CE_{50} de las curvas concentración respuesta al U46619, pero disminuyó ($P < 0,05$) la contracción máxima un 37,5% y 73,2%, respectivamente (**Figura 24, Tabla 11**).

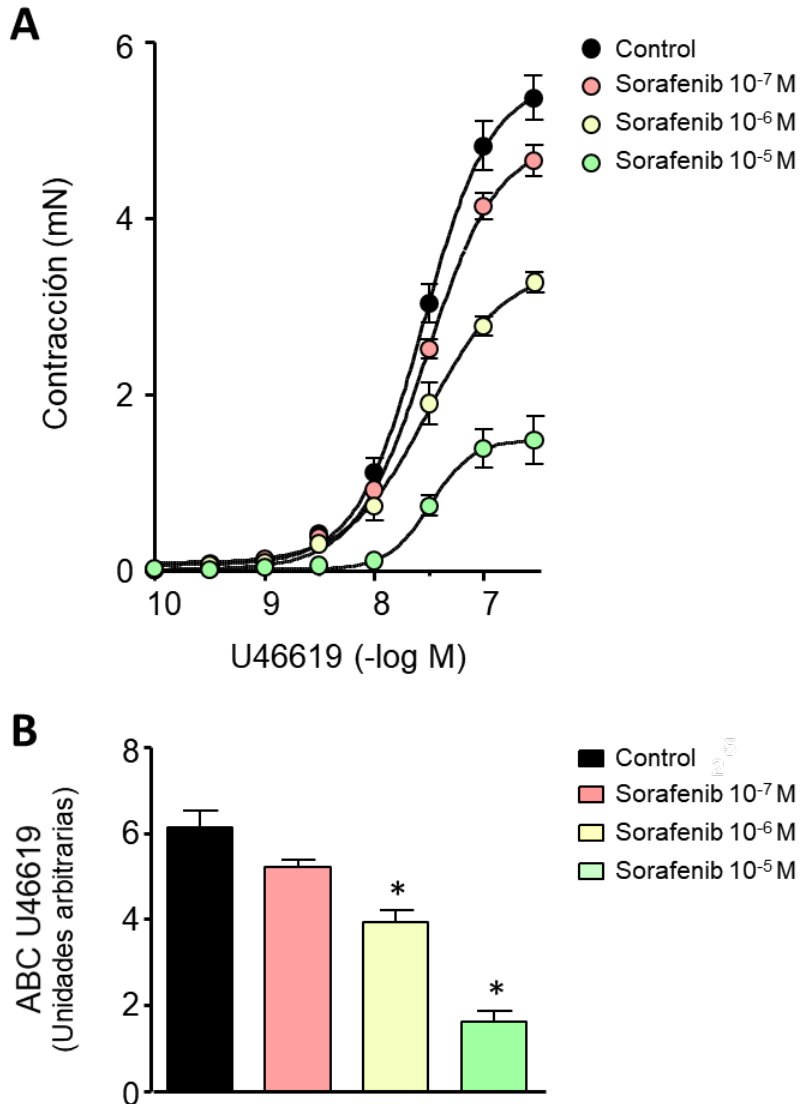


Figura 24. A. Curvas concentración-respuesta al U46619 (10^{-10} - 3×10^{-7} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas al U46619 en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 11. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al U46619 (10^{-8} M) en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

U46619	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$7,51 \pm 0,07$	$5,6 \pm 0,4$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$7,53 \pm 0,04$	$4,5 \pm 0,2$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$7,50 \pm 0,06$	$3,5 \pm 0,1^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$7,49 \pm 0,08$	$1,5 \pm 0,5^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

2.4. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la serotonina.

En la arteria mesentérica la serotonina (10^{-8} - 10^{-4} M) indujo contracción dependiente de la concentración alcanzando un efecto máximo de $5,0 \pm 1,5$ mN y una CE_{50} de $3,41 \times 10^{-7}$ M (**Figura 25, Tabla 12**). La incubación con sorafenib 10^{-7} M no modificó ($P > 0,05$) la contracción inducida por la serotonina. La incubación con sorafenib, 10^{-6} ó 10^{-5} M, disminuyó ($P > 0,05$) la contracción máxima a la serotonina a $3,3 \pm 0,2$ mN y $1,3 \pm 0,3$ mN. Además, incrementó ($P < 0,05$) la CE_{50} desplazando las curvas concentración respuesta a la serotonina hacia la derecha 7,3 y 10,0 veces, respectivamente (**Figura 25, Tabla 12**).

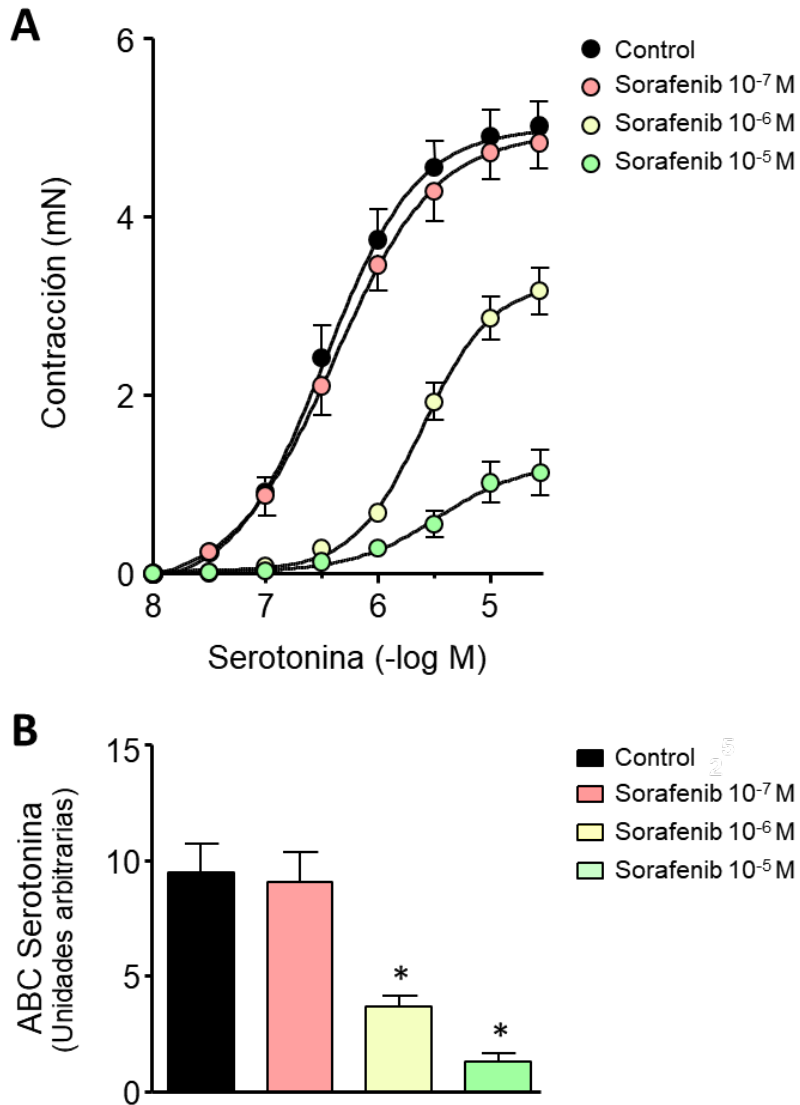


Figura 25. A. Curvas concentración-respuesta a la serotonina (10^{-8} - 10^{-4} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas a la serotonina en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 12. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la serotonina (10^{-8} – 3×10^{-5} M) en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Serotonina	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$6,47 \pm 0,14$	$5,0 \pm 0,3$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$6,39 \pm 0,16$	$4,9 \pm 0,4$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$5,60 \pm 0,09^*$	$3,3 \pm 0,2^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$5,47 \pm 0,18^*$	$1,3 \pm 0,3^*$

n = número de ratones. $*P < 0,05$ comparado con el Control.

2.5. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina.

La noradrenalina (10^{-8} - 10^{-5} M) indujo contracción de la arteria mesentérica alcanzando un efecto máximo de $11,1 \pm 0,8$ mN y una CE_{50} de $5,9 \pm 0,1$ (**Figura 26, Tabla 13**). La incubación de los segmentos aórticos con sorafenib a las concentraciones estudiadas no modificó ($P > 0,05$) la CE_{50} de las curvas a la noradrenalina. La incubación con sorafenib 10^{-6} ó 10^{-5} M disminuyó significativamente el efecto máximo a la noradrenalina un 62,2% y un 89,2%, respectivamente (**Figura 26, Tabla 13**).

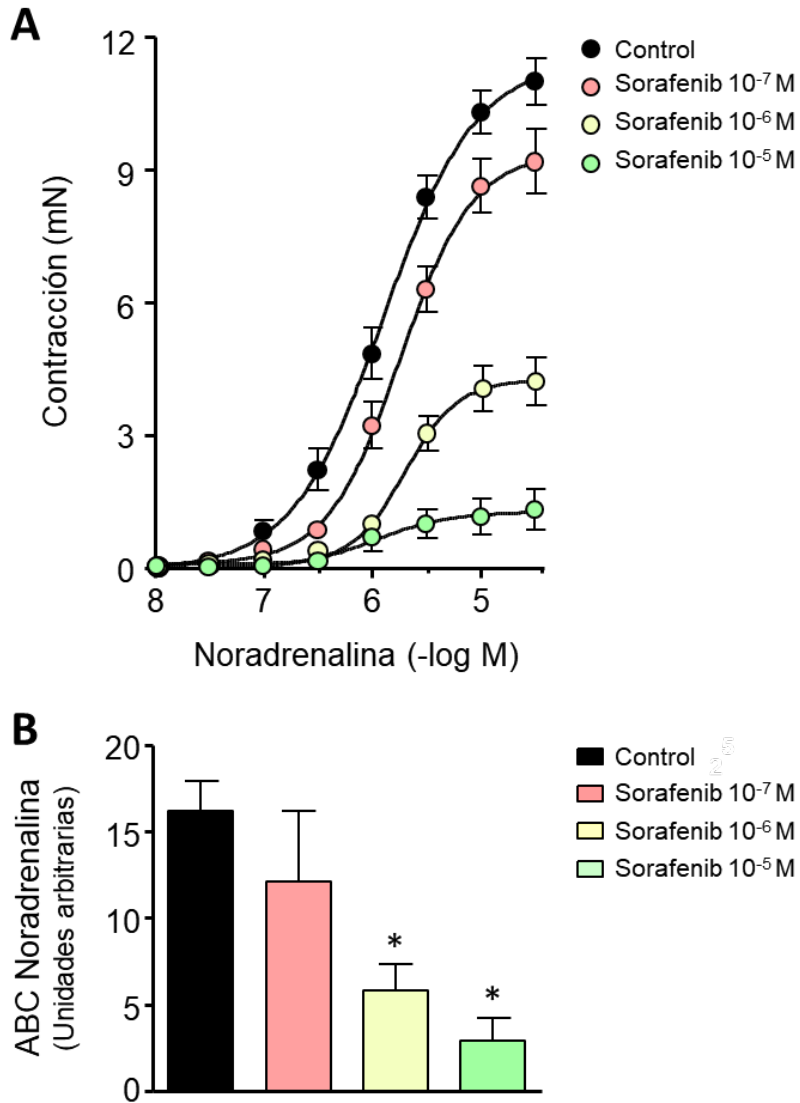


Figura 26. A. Curvas concentración-respuesta a la noradrenalina (10^{-8} - 3×10^{-5} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas a la noradrenalina en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 13. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la noradrenalina en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Noradrenalina	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (mN)
Control	7	$5,90 \pm 0,08$	$11,1 \pm 0,8$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$5,75 \pm 0,10$	$9,4 \pm 1,0$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$5,71 \pm 0,11$	$4,2 \pm 0,7^*$
Sorafenib 10^{-5} M	8	#	$1,2 \pm 0,5^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

la pD_2 no se calculó al no alcanzar la noradrenalina una contracción máxima mayor del 15% de la contracción máxima control.

2.6. Efectos del sorafenib sobre la curva concentración-respuesta a la acetilcolina.

En segmentos de arteria mesentérica con endotelio previamente contraídos con serotonina, la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del $97,1 \pm 1,4\%$ y una CE_{50} de $1,48 \times 10^{-8}$ M (**Figura 27**). En segmentos sin endotelio la acetilcolina no produjo relajación, corroborando la necesidad de un endotelio funcional para que la acetilcolina produzca relajación del músculo liso vascular.

La participación de los factores relajantes de origen endotelial que participan en la respuesta relajante a la acetilcolina se estudió en anillos previamente contraídos e inhibiendo progresivamente la COX, la NOS y los canales de K^+ activados por Ca^{2+} . La inhibición de la síntesis de prostaglandinas con indometacina (10^{-5} M) no modificó ($P > 0,05$) la respuesta control a la acetilcolina. La incubación con indometacina más L-NAME (10^{-4} M) para inhibir además la síntesis de NO inhibió ($P < 0,05$) un 7,6% la relajación máxima a la acetilcolina (**Figura 27**). La relajación obtenida después de inhibir

la COX y la NOS, fue totalmente abolida con la adición al baño de charibdotoxina (10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M). Estos resultados ponen de manifiesto la contribución del EDHF en la relajación a la acetilcolina en segmentos de arteria mesentérica (**Figura 27**).

La incubación con sorafenib 10^{-7} M ó 10^{-6} M no modificó ($P > 0,05$) la relajación a la acetilcolina. El aumento de la concentración de sorafenib a 10^{-5} M no modificó ($P > 0,05$) la CE_{50} de la curva concentración-respuesta a la acetilcolina, pero inhibió significativamente la relajación máxima a la acetilcolina (**Figura 28, Tabla 14**).

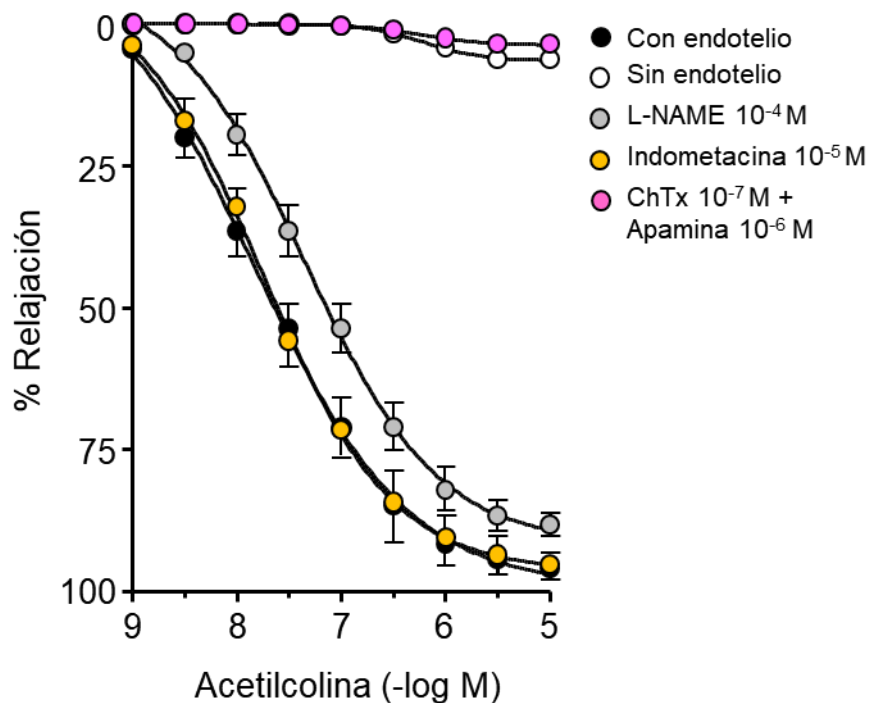


Figura 27. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-4} M) en segmentos de arteria mesentérica, previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M), en anillos con y sin endotelio, y con endotelio en presencia de indometacina (10^{-5} M), indometacina más L-NAME (10^{-4} M) e indometacina más L-NAME más charibdotoxina (ChTx 10^{-7} M) y apamina (10^{-6} M).

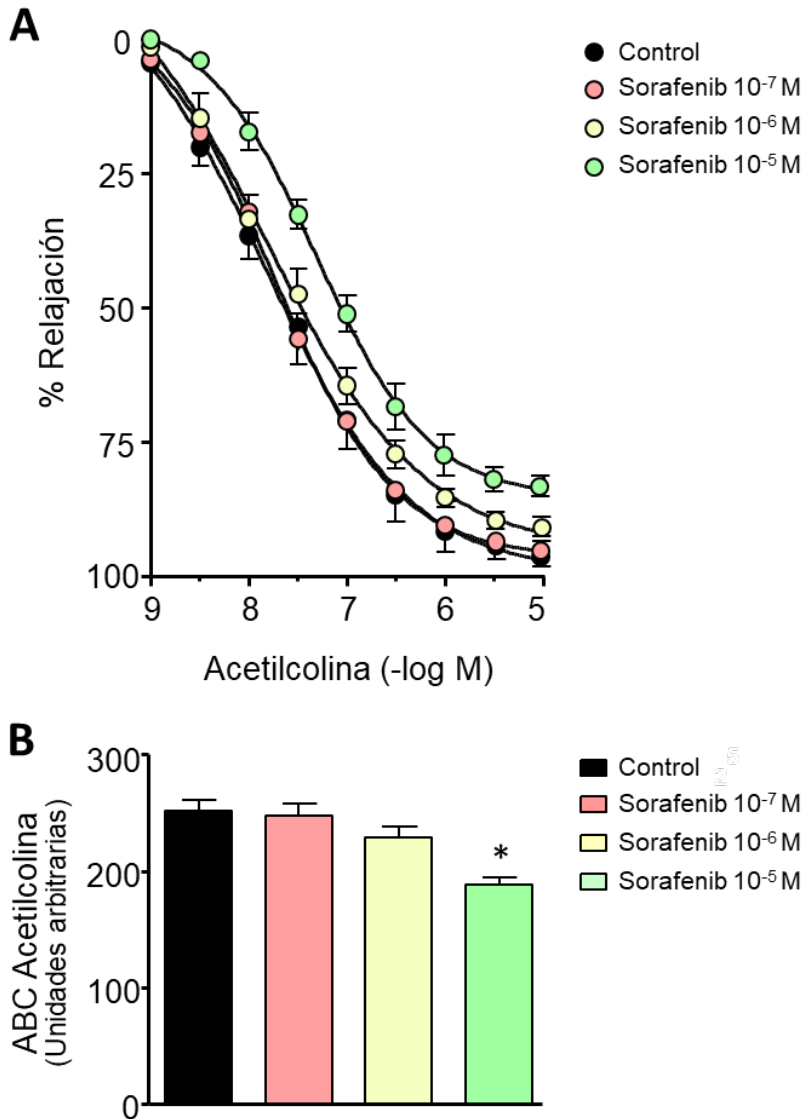


Figura 28. A. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas a la acetilcolina en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 14. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta a la acetilcolina en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Acetilcolina	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	7	$7,83 \pm 0,20$	$97,1 \pm 1,4$
Sorafenib 10^{-7} M	8	$7,74 \pm 0,16$	$96,6 \pm 1,8$
Sorafenib 10^{-6} M	8	$7,82 \pm 0,19$	$95,3 \pm 1,6$
Sorafenib 10^{-5} M	8	$7,31 \pm 0,08$	$85,4 \pm 2,1^*$

n = número de ratones. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

2.7. Efecto del sorafenib sobre las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato.

En segmentos de arteria mesentérica con endotelio y contraídos con serotonina (10^{-5} M) el nitroprusiato (10^{-11} - 3×10^{-8} M) produjo relajación dependiente de la concentración con un efecto máximo del 100% y una CE_{50} de $3,26 \times 10^{-10}$ M (**Figura 29**). La eliminación del endotelio no modificó la relajación al nitroprusiato, ni el efecto máximo ni la CE_{50} de las curvas al nitroprusiato ($3,88 \times 10^{-10}$ M *versus* con endotelio $3,26 \times 10^{-10}$ M, $P > 0,05$), demostrando que el nitroprusiato induce relajación independientemente de la presencia de un endotelio funcional al actuar directamente sobre el músculo liso vascular (**Figura 29**).

La incubación con sorafenib 10^{-7} , 10^{-6} o 10^{-5} M no modificó ($P > 0,05$) la relajación al nitroprusiato (**Figura 30, Tabla 15**).

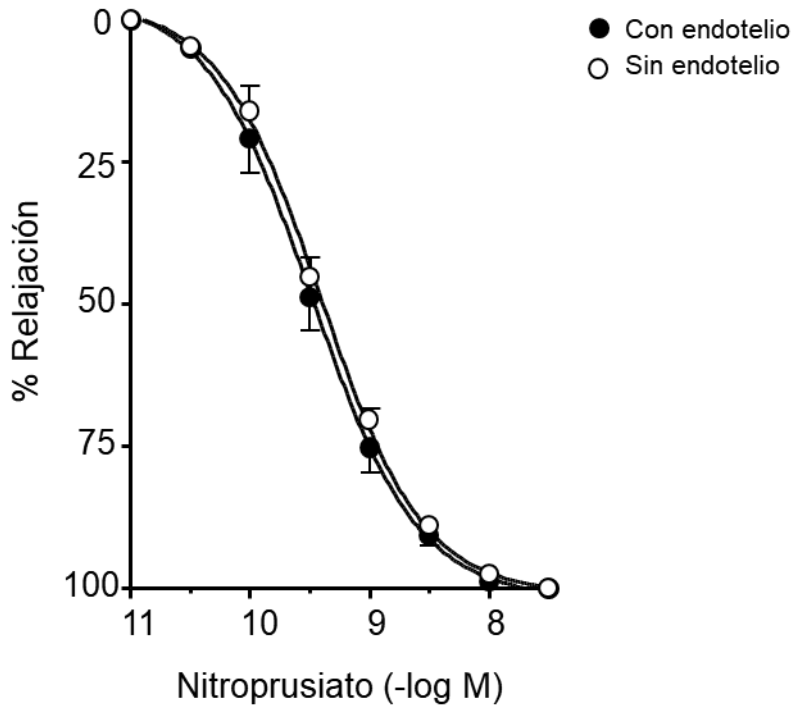


Figura 29. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (10^{-11} - 3×10^{-8} M) en segmentos de arteria mesentérica con o sin endotelio previamente contraídos con serotonina (10^{-5} M).

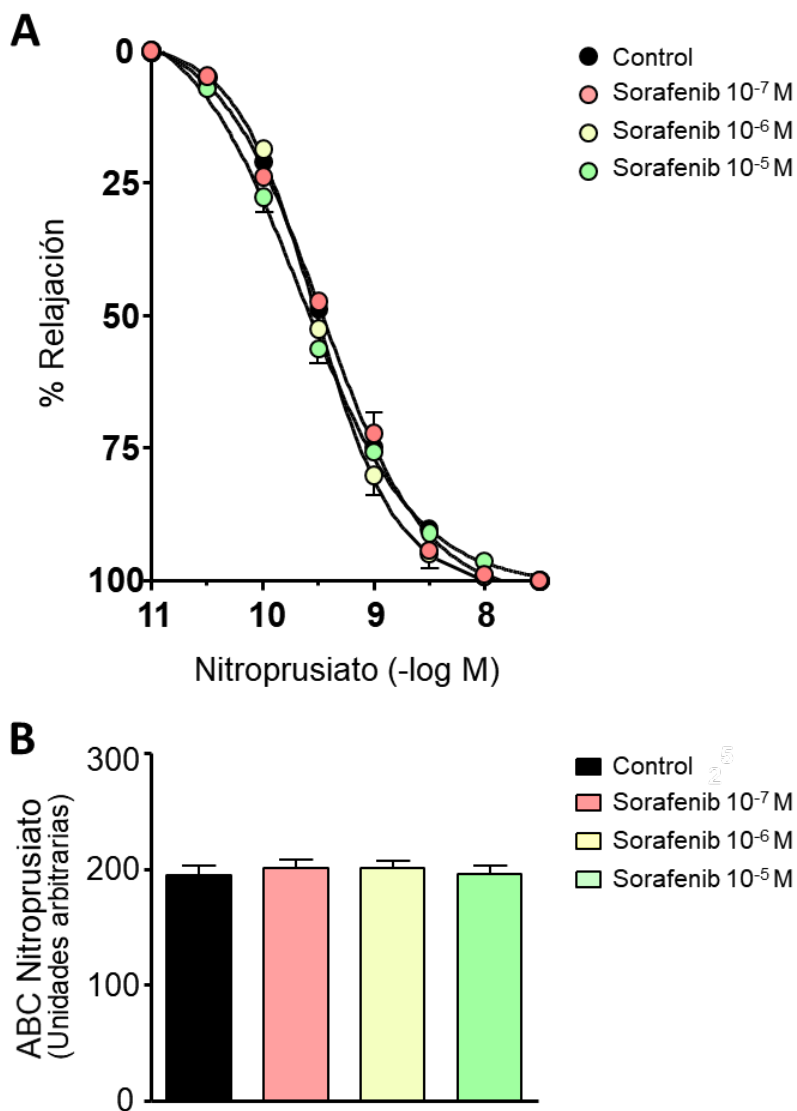


Figura 30. A. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato (10^{-11} - 3×10^{-8} M) y B. área bajo la curva (ABC) de las curvas al nitroprusiato en segmentos de arteria mesentérica de ratón en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M). * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Tabla 15. Valores de la pD_2 ($-\log CE_{50}$) y del efecto máximo (E_{max}) de las curvas concentración-respuesta al nitroprusiato en ausencia (Control) y en presencia de sorafenib (10^{-7} - 10^{-5} M).

Nitroprusiato	<i>n</i>	pD_2	E_{max} (%)
Control	7	$9,49 \pm 0,06$	100
Sorafenib 10^{-7} M	8	$9,52 \pm 0,04$	100
Sorafenib 10^{-6} M	8	$9,65 \pm 0,05$	100
Sorafenib 10^{-5} M	8	$9,47 \pm 0,05$	100

n = número de ratones.

3. Efecto del sorafenib sobre la producción de anión superóxido en la pared vascular.

Los niveles de O_2^- se determinaron en cortes transversales de aórtica torácica. Experimentos previos han demostrado que el U46619 al activar receptores TP induce la producción de O_2^- en la pared vascular. En secciones de aorta torácica el tratamiento con U46619 (10^{-8} M) incrementó ($P < 0,05$) la producción de O_2^- (**Figura 31**). El tratamiento con Tempol (10^{-3} M) no modificó ($P > 0,05$) los niveles basales de fluorescencia. Sin embargo, el tratamiento con Tempol (10^{-3} M) previno el incremento de la fluorescencia inducido por el U46619 (**Figura 31**), indicando que este incremento es debido a un incremento de los niveles del O_2^- inducido por el U46619.

Para determinar si el sorafenib induce la producción de O_2^- en la pared vascular, cortes de aorta torácica se incubaron con sorafenib y se determinó la fluorescencia a la DHE. El tratamiento con sorafenib 10^{-7} M incrementó ($P < 0,05$) un 26,7% los niveles de O_2^- (**Figura 32**). La incubación con concentraciones mayores de sorafenib 10^{-6} y 10^{-5} M incrementó

significativamente los niveles de O_2^- un 32,5% y un 29,4% (**Figura 32**), indicando que el sorafenib induce un incremento moderado de la producción de O_2^- en la pared vascular. El pretratamiento con Tempol (10^{-3} M) previno el incremento en los niveles de O_2^- inducidos por el sorafenib (**Figura 33**).

A pesar del moderado incremento de O_2^- inducido por el sorafenib, este podría potenciar la producción de O_2^- inducido por otras sustancias. Para estudiar esta posibilidad, cortes transversales de aorta se incubaron con U46619 y sorafenib. La incubación con U46619 (10^{-8} M) incrementó significativamente los niveles de O_2^- y la incubación conjunta de U46619 y sorafenib 10^{-7} , 10^{-6} o 10^{-5} M no incrementó ($P > 0,05$) los niveles de O_2^- inducidos por el U46619 (**Figura 34**), descartando una posible interacción entre estas dos sustancias.

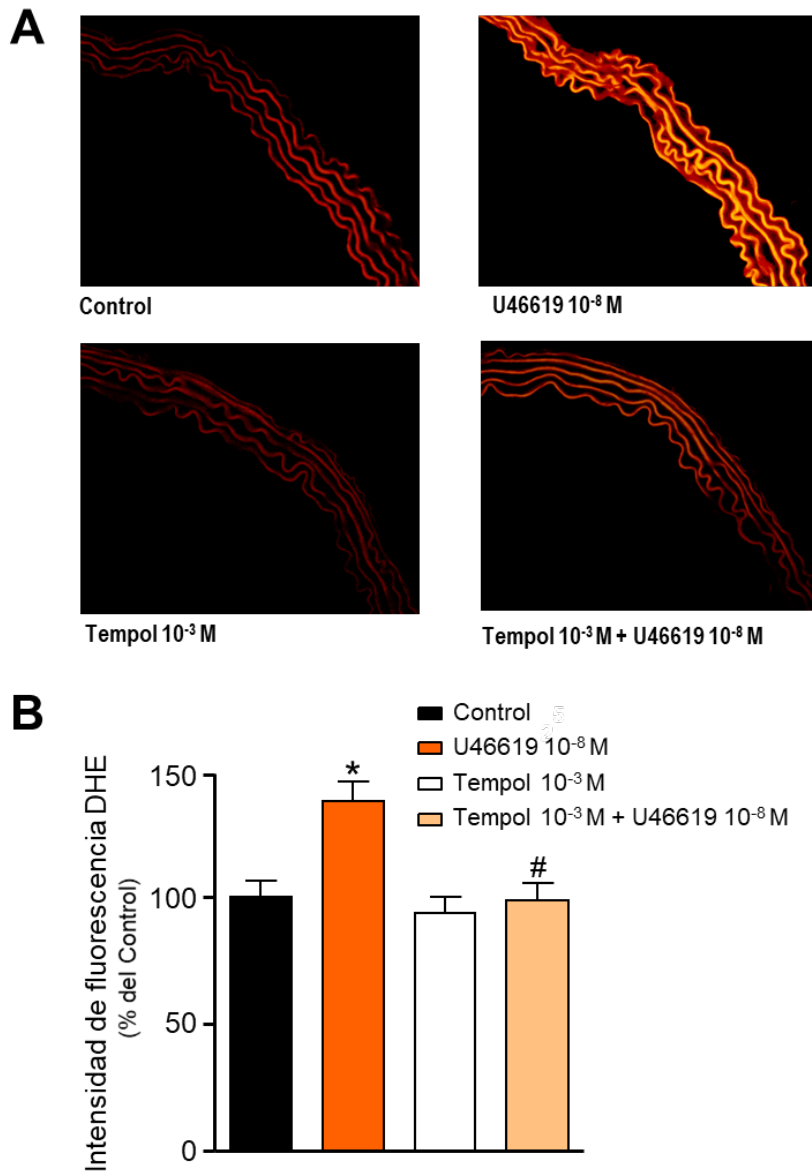


Figura 31. A. Imágenes representativas y B. Cuantificación de los niveles de O_2^- determinados por la fluorescencia al dihidroetidio (DHE) en secciones transversales de aorta en ausencia (Control) y en presencia de U46619 (10^{-8} M), de Tempol (10^{-3} M) y de U46619 más Tempol. * $P < 0,05$ comparado con el Control; # $P < 0,05$ comparado con tratado con U46619.

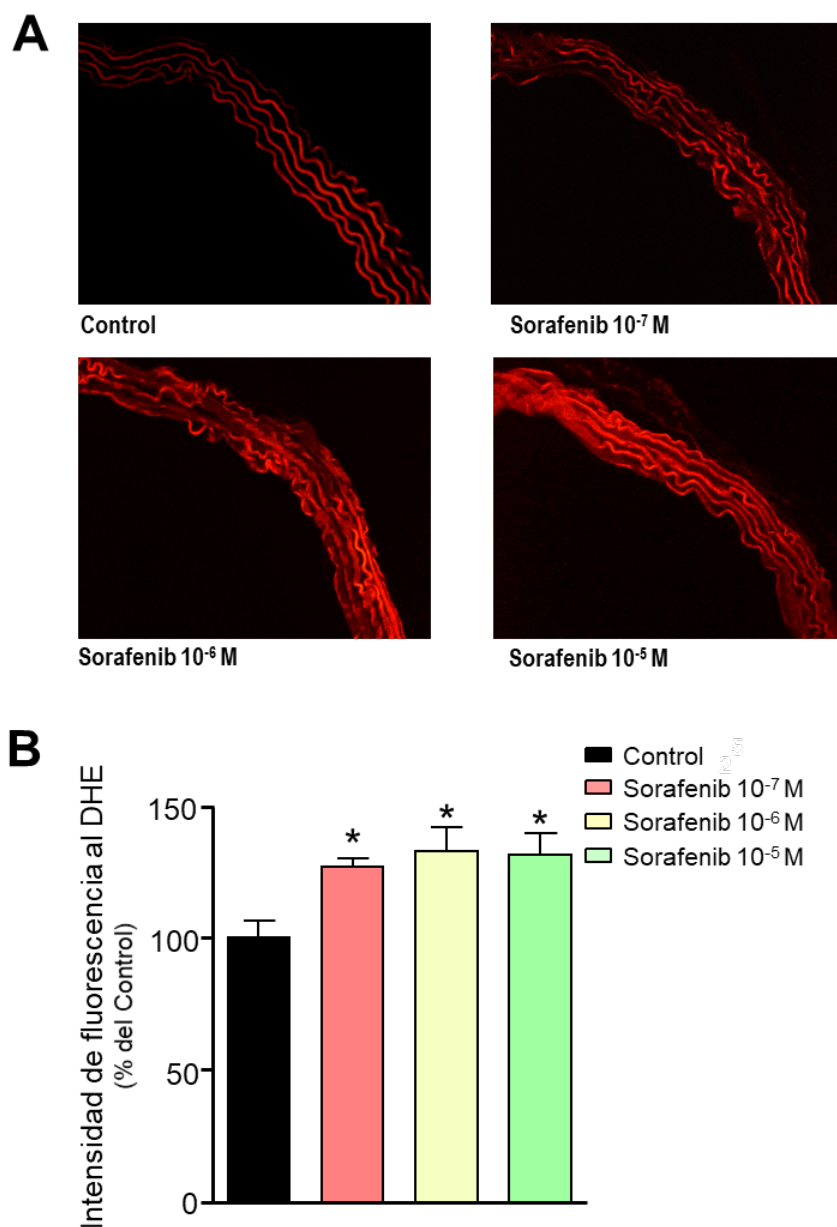


Figura 32. **A.** Imágenes representativas y **B.** Cuantificación de los niveles de O₂ determinados por la fluorescencia al dihidroetidio (DHE) en secciones transversales de aorta en ausencia (Control) y en presencia sorafenib 10⁻⁷, 10⁻⁶ ó 10⁻⁵ M. **P* < 0,05 comparado con el Control.

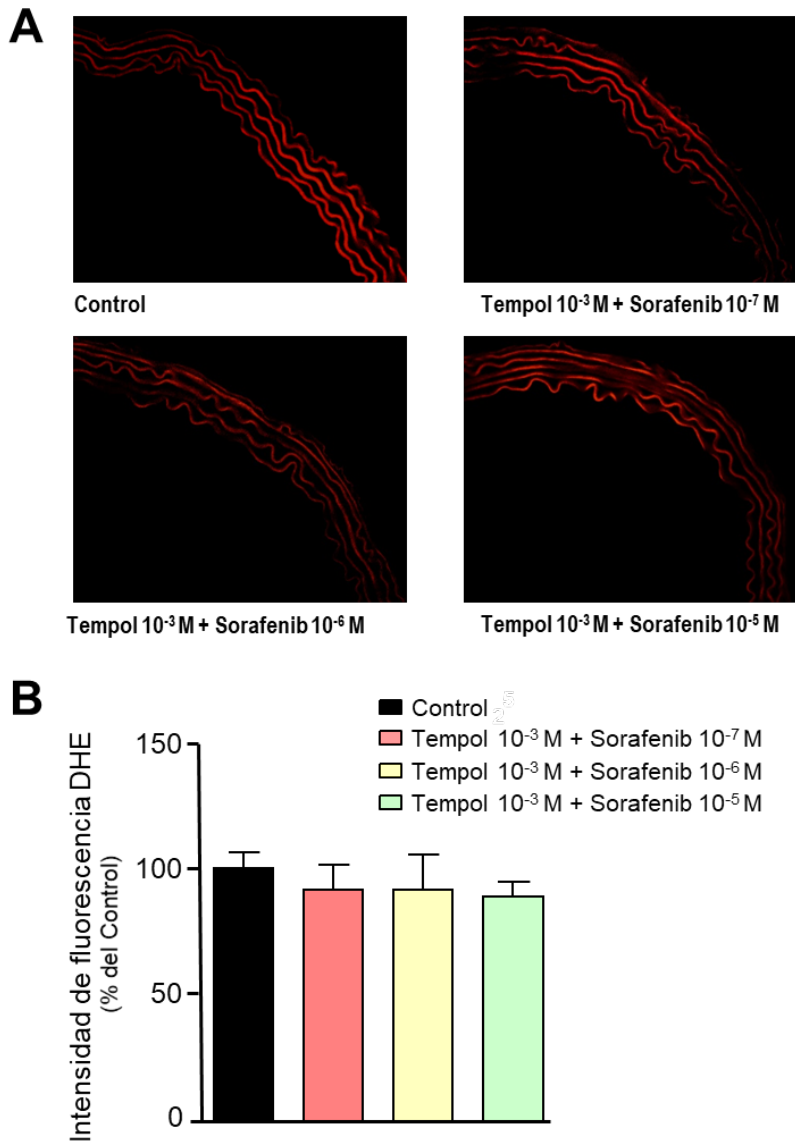


Figura 33. A. Imágenes representativas. B. Cuantificación de los niveles de O_2^- determinados por la fluorescencia al dihidroetidio (DHE) en secciones transversales de aorta en ausencia (Control) y en presencia de Tempol 10^{-3} M más sorafenib 10^{-7} , 10^{-6} ó 10^{-5} M. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

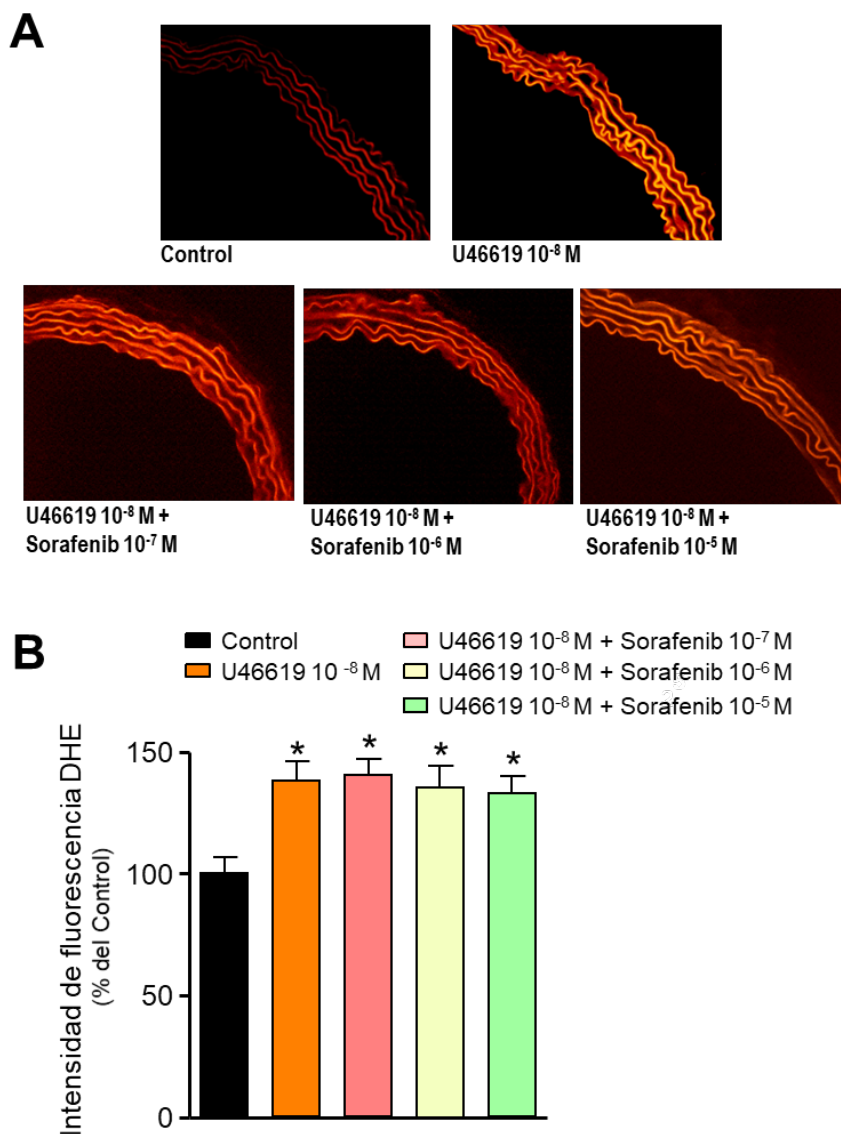


Figura 34. **A.** Imágenes representativas y **B.** Cuantificación de los niveles de O_2^- determinados por la fluorescencia al dihidroetidio (DHE) en secciones transversales de aorta en ausencia (Control) y en presencia de U46619 (10^{-8} M) y de U46619 (10^{-8} M) más sorafenib 10^{-7} , 10^{-6} ó 10^{-5} M. * $P < 0,05$ comparado con el Control.

Discusión

Los resultados presentados indican que el sorafenib, a concentraciones que pueden encontrarse en pacientes con CHC avanzado, afecta a mecanismos de contracción y relajación del músculo liso vascular, disminuyendo la contracción inducida por la despolarización de la membrana celular y entrada de Ca^{2+} extracelular y la provocada por potentes agentes contráctiles como el U46619, un análogo del tromboxano A_2 , serotonina y noradrenalina. Además, disminuye la biodisponibilidad del NO en la relajación dependiente del endotelio inducida por la acetilcolina.

El sorafenib es un fármaco aprobado para el tratamiento del CHC avanzado y ha representado un importante avance en el tratamiento de estos pacientes. El sorafenib inhibe la proliferación celular, la angiogénesis y aumenta la apoptosis en determinados tumores (56, 165). Actúa inhibiendo receptores con actividad serina-treonina quinasa y receptores con actividad tirosina quinasa tales como los receptores VEGFR y el receptor PDGFR (56, 165) Estos factores de crecimiento están involucrados en el origen del CHC (166-169) y constituyen, por tanto, el fundamento del uso del sorafenib en su tratamiento.

En nuestro estudio hemos comprobado que el sorafenib a tensión basal no induce ningún cambio en el tono vascular, pero cuando el vaso está contraído el sorafenib produce vasodilatación. En arterias expuestas a una elevada concentración extracelular de K^+ , que induce la despolarización de la membrana y la entrada de Ca^{2+} al interior celular, el sorafenib produce vasorrelajación. Además, cuando la contracción fue inducida por la activación de receptores específicos acoplados a proteína G, en concreto cuando se utilizó un agonista de los receptores TP del tromboxano A_2 , el sorafenib también indujo relajación. En los mecanismos implicados en la vasorrelajación inducida por el sorafenib

podrían participar sustancias relajantes derivadas del endotelio, concretamente el NO y la PGI₂. Tanto la inhibición de la NOS como de la COX no modificó la relajación al sorafenib descartando la participación de estas sustancias de origen endotelial en la relajación al sorafenib. Se ha demostrado que el sorafenib induce la muerte de las células tumorales a través de la formación de O₂⁻ (63), una sustancia que puede reaccionar con otras generadas en la pared vascular y alterar la función vascular. La eliminación de O₂⁻ con un quelante del mismo, el Tempol, no modificó la relajación inducida por el sorafenib. Descartando al O₂⁻ como un mediador en la respuesta relajante inducida por el sorafenib.

La acción vasodilatadora del sorafenib sobre el músculo liso requiere elevadas concentraciones, más altas que las que inhiben efectivamente las principales quinasas diana del fármaco, pero que se pueden encontrar en los pacientes tratados con sorafenib, más teniendo en cuenta que muchos de ellos pueden tener insuficiencia hepática, y por tanto una menor eliminación del fármaco. La concentración de sorafenib que induce relajación del músculo liso aórtico es similar o menor a la descrita para otros inhibidores de los receptores tirosina quinasa que inhiben la contracción muscular (170-173).

Una observación inesperada y potencialmente importante fue que el efecto vasodilatador del sorafenib fue más eficaz cuando el estímulo constrictor incrementó la sensibilidad al Ca²⁺ que cuando la contracción fue inducida por despolarización de la membrana plasmática y apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Aunque no se conocen los mecanismos moleculares por los que el sorafenib produce relajación, una posible vía sería a través de la inhibición de la actividad de la quinasa y/o la ruta de señalización que regula la sensibilidad al Ca²⁺, como la vía de señalización de la Rho/ROK (174). Estos resultados sugieren que el sorafenib tendría una acción vasodilatadora sobre el

músculo liso vascular a través de la inhibición de quinasas relacionadas con el VEGF y sus receptores en las células de músculo liso vascular.

Profundizando en los mecanismos por los que el sorafenib induce relajación del músculo liso vascular, se estudió cómo afecta el sorafenib a la contracción independiente de la activación de receptor e inducida por altas concentraciones extracelulares de K^+ . El KCl produjo contracción, al producir despolarización de la membrana seguida de contracción del músculo liso vascular, constituyendo una prueba de la capacidad contráctil. En presencia de nifedipina la respuesta al KCl disminuyó, indicando que la contracción es debida, en gran parte, a la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de Ca^{2+} sensibles a las dihidropiridinas.

Para investigar el papel de la ROK en la contracción inducida por altas concentraciones de KCl en el músculo liso aórtico, se evaluaron los efectos del Y-27632, un inhibidor específico de la ROK (175). La inhibición de la ROK disminuyó la contracción inducida por el KCl indicando que en la contracción inducida por la entrada de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo-L provoca la activación de la ROK y la sensibilización del músculo liso al Ca^{2+} .

El sorafenib disminuyó la contracción al KCl en aorta y arteria mesentérica, esta menor respuesta contráctil estaría relacionada con alteraciones en los mecanismos de contracción mediados por el Ca^{2+} . Los efectos del sorafenib sobre la contracción inducida por la entrada del Ca^{2+} extracelular se estudió en aorta y arteria mesentérica mediante el estudio de la respuesta al $CaCl_2$ en un medio sin Ca^{2+} (con KCl 60 mM). En aorta de ratón el $CaCl_2$ indujo contracción que fue totalmente abolida por la nifedipina indicando que la contracción es

debida a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. Por otra parte, la inhibición de la ROK inhibió parcialmente la contracción inducida por el CaCl_2 , sugiriendo que en la contracción mediada por la entrada de Ca^{2+} extracelular se produce la activación de la ROK y los mecanismos que inducen la sensibilización del músculo liso al Ca^{2+} . En aorta y arteria mesentérica de ratón, la incubación con sorafenib disminuyó significativamente la respuesta contráctil al CaCl_2 , indicando que el sorafenib podría inhibir las vías activadas por el Ca^{2+} extracelular que inducen la contracción del músculo liso vascular.

Respuesta al tromboxano A_2 .

Diversos estudios sugieren que la sensibilización al Ca^{2+} (contracción de las células del músculo liso mediada por la inhibición de la MLCP) desempeña un papel esencial en la fase de contracción sostenida inducida por varios agonistas contráctiles del músculo liso vascular (176, 177). El TxA_2 , un metabolito inestable del ácido araquidónico, es un potente vasoconstrictor (178-180) que está implicado en el control del tono vascular y en la activación y agregación plaquetaria (181, 182). El TxA_2 fue originalmente descubierto por Samuelsson *et al.* (183), y es un miembro de la familia de los prostanoídes, sintetizado a través de la acción de las COXs y la TxA_2 sintasa (TxS) a partir de la activación de la PLA₂ (184). Producido predominantemente en plaquetas y también en músculo liso, se ha demostrado que el TxA_2 está involucrado en un gran número de patologías, entre las que se incluyen hipertensión pulmonar (185), aterotrombosis (186), lesión por isquemia-reperfusión (187) y vasoespasmo coronario (188). Esto subraya la importancia del TxA_2 en la modulación del tono vascular. Sin embargo, debido a que su vida media es muy corta, aproximadamente 30 segundos, y a su rápida degradación a una forma inactiva,

el TxB₂ (183), los estudios hasta ahora se han realizado principalmente con los miméticos estables del TxA₂ como el U46619 que activan al receptor del TxA₂ (TP).

El receptor TP es un miembro de la familia de receptores de membrana acoplados a proteína G (189). Existen diversas proteínas G que se pueden acoplar al receptor TP (190-193) de las que las familias G_{9/11} y G_{12/13} parecen ser las más relevantes para la función del receptor TP (194). La proteína G_q fue la primera proteína G trimérica que se describió que se acoplaba al receptor TP (195). La activación de las proteínas G de la familia G₉, (G₉, G₁₁, G₁₅ y G₁₆) (191, 193), producen la activación de la PLC-β, dando como resultado el acúmulo de IP₃ y DAG, que a su vez inducen la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico y la activación de la PKC, respectivamente (196, 197). Además de la G₉, se ha demostrado que el receptor TP es capaz de comunicarse con las proteínas G de la familia G₁₂ (G₁₂ y G₁₃) (192), G_i (198) y G_s (199). La activación de la familia G₁₂ activa al factor de intercambio de nucleótidos de guanina de la proteína G pequeña Rho (RhoGEF, del inglés *guanine nucleotide exchange factor of the small G protein Rho*) que activa la señalización mediada por Rho (200). Las proteínas de la familia Rho son reguladoras clave de una variedad de efectos asociados con cambios en el citoesqueleto de actina, tales como migración celular, adhesión y contracción muscular (201-203).

Los experimentos en aorta de ratón indican que el mimético del TxA₂, el U46619, induce contracción del músculo liso de manera concentración dependiente. El papel que juegan los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L en la contracción inducida por el TxA₂ es heterogéneo dependiendo del lecho vascular y la especie considerada. Se ha demostrado que el bloqueo con nifedipina de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje de tipo L reduce

parcialmente la contracción inducida por la activación del receptor de TP en arterias (204, 205) y venas (206) pulmonares, y en la aorta de rata (207), mientras que suprime la contracción en las arterias retinianas de resistencia (208). En aorta de ratón, la nifedipina no modificó la contracción inducida por el U46619, lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L no juega un papel importante en la contracción al TxA_2 . La persistencia de contracción en presencia de nifedipina sugiere que otras vías de entrada de Ca^{2+} distintas a los canales dependientes de voltaje tipo L contribuirían a la contracción inducida por el U46619. En la aorta de rata y las arterias pulmonares, se ha descrito que la entrada de Ca^{2+} estaría mediada por canales de Ca^{2+} operados por receptor (207, 209).

El fenómeno de sensibilización al Ca^{2+} , en el que algunos agonistas como el TxA_2 inducen contracción sin cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ o con ligeros incrementos (177), ha sido explicado por diversos mecanismos moleculares en los que participa la inhibición de la MLCP (75). El mecanismo de sensibilización al Ca^{2+} dependiente de la ROK está mediado por un mayor nivel de fosforilación de MLC_{20} debido a la inhibición de la fosfatasa (MLCP), enzima responsable de la desfosforilación de MLC_{20} y relajación de las células musculares lisas (210). La regulación de la actividad de la MLCP es un mecanismo importante del aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} del aparato contráctil de la célula muscular lisa (211). Además de su función en la sensibilización de las proteínas contráctiles al Ca^{2+} , la ROK está involucrada en la activación dependiente de la proteína G de los canales catiónicos no selectivos que da como resultado una elevación adicional de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y una mayor contracción de los vasos (212).

Para investigar la implicación de la ROK en la contracción inducida por el estímulo del receptor TP, evaluamos los efectos del Y-27632, un inhibidor

específico de la ROK (175). En aorta de ratón la inhibición de la ROK disminuyó la contracción al U46619 un 63%, indicando que es una vía de señalización importante para la transducción de la señal de los receptores y que la contracción al U46619 dependiente de la activación de mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} .

Se ha demostrado que una de las dianas del sorafenib es la ROK, a través de la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK (52, 61, 213), que induce la inhibición de la ROK, esta inhibición mantiene o incrementa la actividad de la MLCP y por lo tanto disminuye el nivel de fosforilación de la MLC_{20} , que induce relajación de las células musculares lisas. En aorta y arteria mesentérica de ratón el sorafenib produjo inhibición de la contracción al U46619 a concentraciones $1\mu\text{M}$, el incremento de la concentración produjo una mayor inhibición de la contracción. Teniendo en cuenta la importancia de la ROK en la señalización de potentes agentes constrictores como el TxA_2 , se ha considerado a la ROK como un objetivo para el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a la corrección de espasmos de vasos cerebrales, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, hipertensión, hipertensión pulmonar, afecciones isquémicas e insuficiencia cardíaca (214-216).

Se ha propuesto la utilización del sorafenib para disminuir la elevada resistencia intrahepática que puede aparecer durante la cirrosis (217). En ratas con cirrosis biliar inducida por ligadura y escisión de los conductos biliares se produce un incremento de la resistencia vascular intrahepática que provoca importantes alteraciones hemodinámicas, como el incremento de la presión portal (218, 219). En este modelo de cirrosis se ha demostrado que el tratamiento con sorafenib e inhibición de la ROK en los vasos intrahepáticos disminuye la resistencia

intrahepática y reduce la presión portal mediante la inhibición de la ROK (217, 220).

La inhibición de la contracción al TxA_2 inducida por el sorafenib en aorta de ratón podría tratarse de un efecto específico sobre los receptores TP o bien podría afectar a mecanismos comunes de la contracción activados por otros factores contráctiles. Para clarificar este punto, se estudiaron los efectos del sorafenib sobre la contracción inducida por otras sustancias contráctiles, la serotonina y la noradrenalina. La serotonina es un potente vasoconstrictor en la aorta de ratón (221). Los efectos de la serotonina están mediados por la familia de receptores de serotonina. Entre los receptores de la serotonina, el receptor 5-HT_{2A} es uno de los -más estudiados y su inhibición está generalmente asociada con efectos antidepresivos y antipsicóticos (222). Además, el receptor 5-HT_{2A} tiene un importante papel en la regulación de la función cardiovascular (223).

En aorta de ratón la serotonina produce una potente contracción y estudios previos indican que está mediada por la activación del receptor 5-HT_{2A} (221). La activación del receptor 5-HT_{2A} provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} de tipo L, la activación de la PLC y la activación de vías de señalización dependientes de tirosina quinasas (221). De estos mecanismos el que produce una mayor reducción de la contracción a la serotonina es la inhibición de las tirosina quinasas (221). Debido a que la contracción inducida por la serotonina no es completamente abolida en presencia de ninguno de los inhibidores de las diferentes vías de señalización, es probable que la combinación de estas tres vías sea la responsable de la contracción a la serotonina en aorta de ratón (221).

En aorta y arteria mesentérica de ratón el sorafenib inhibió la contracción inducida por la serotonina de forma concentración dependiente, indicando que el sorafenib es capaz de inhibir los mecanismos de contracción activados por la serotonina. Los efectos inhibidores del sorafenib sobre la contracción de la

serotonina fueron más marcados que los observados para el U46619, lo que sugiere que el sorafenib pueda ejercer su efecto inhibitor por mecanismos adicionales a los que inhiben la respuesta contráctil al U46619.

La caracterización del perfil de los receptores de serotonina antagonizados por el sorafenib indica que el sorafenib es un ligando promiscuo, uniéndose fuertemente a los receptores 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, y débilmente a otros cinco receptores de la serotonina, entre los que se encuentran el 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{5A}, 5-HT₆ y 5-HT₇ (224). Ensayos funcionales a nivel celular validan al sorafenib como un antagonista de los receptores 5-HT_{2A}, inhibiendo un 93% de la actividad de los receptores a una concentración de 50µM (224). Aunque en la actualidad, se desconoce si el sorafenib se une a otros receptores monoaminérgicos acoplados a proteína G, es muy probable que lo haga teniendo en cuenta la promiscuidad del sorafenib y la similitud entre los receptores monoaminérgicos (224).

Muchos compuestos designados como fármacos específicos para sus dianas terapéuticas en realidad no son tan selectivos, y posteriormente se ha descubierto que se unen a otras dianas con similares afinidades de unión (225-227). En los últimos años, la identificación de estas nuevas dianas de fármacos que se utilizan en la práctica clínica es una actividad de gran interés, puesto que ya se conoce la distribución del fármaco, su biodisponibilidad y sus mecanismos de eliminación. Además se conocen sus efectos secundarios y han pasado todos los controles sanitarios (228-231).

Considerando que las concentraciones de sorafenib que inhiben a las tirosina quinasas y las que inhiben algunos receptores de serotonina se encuentran en la misma ventana terapéutica, se podría considerar que algunos de los efectos del

sorafenib sobre el CHC podrían estar mediados por la inhibición de los receptores 5-HT. Diversos estudios indican que la serotonina y los receptores 5-HT pueden estar implicados en la supervivencia celular y el crecimiento de las células en el CHC (232-234), sugiriendo que la actividad del sorafenib sobre los receptores de serotonina pueda causar efectos deletéreos sobre las células del CHC.

Respuesta a la noradrenalina.

Un factor importante en la regulación del tono vascular es la actividad de las fibras nerviosas simpáticas perivasculares que liberan noradrenalina, causando vasoconstricción mediante la activación de receptores α adrenérgicos en las células del músculo liso (235, 236). Entre los receptores α adrenérgicos del músculo liso vascular se encuentran los receptores α_1 y α_2 .

La activación de los receptores α_1 -adrenérgicos induce contracción del músculo liso por: 1) despolarizar la membrana que provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L o tipo T e inducir la entrada de Ca^{2+} , 2) activar directamente los canales de Ca^{2+} para inducir la entrada de Ca^{2+} , 3) liberar Ca^{2+} de las reservas intracelulares y 4) activar vías que incrementan la sensibilidad al Ca^{2+} (237).

Los receptores α_1 -adrenérgicos se acoplan a una amplia variedad de sistemas de segundos mensajeros a través de las proteínas G, predominantemente se asocian a las proteínas G de la familia $G_{9/11}$ y activan la PLC (238, 239). La activación de todos los subtipos de receptores α_1 a través de la PLC induce la formación de IP_3 y DAG. El DAG estimula la PKC y el IP_3 actúa sobre su receptor en el retículo endoplásmico para liberar el Ca^{2+} almacenado, el resultado neto es un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (238, 239). El receptor α_1 -adrenérgico también puede

provocar la activación de la PLA₂ y la liberación de ácido araquidónico (240), posiblemente a través de G_i/G₀ (241), también provoca la liberación del ácido araquidónico por activación de PLD (242) que incrementa los niveles de AMPc (240, 243). Además de la señalización a través de las proteínas G heterotriméricas, los receptores α₁-adrenérgicos pueden mediar respuestas a través de otros mecanismos. Concretamente, los receptores α₁ adrenérgicos pueden inducir la sensibilización al Ca²⁺ a través de la activación de la vía RhoA/ROK (244) que fosforila e inhibe a la MLCP (177).

En la aorta de ratón la noradrenalina no indujo una contracción significativa, se observaron grandes diferencias entre las aortas de diferentes animales. Estas diferencias pueden ser debidas al tipo de receptor activado por la noradrenalina y a diferencias regionales en cuanto a densidad y tipos de receptores adrenérgicos (245). En aorta torácica de ratón se ha demostrado que la contracción máxima a la noradrenalina es aproximadamente 0,63 mN, esta baja respuesta contráctil a la noradrenalina se ha relacionado con una gran densidad de receptores α_{2A/D} que median inhibición de la contracción (246).

La noradrenalina en la arteria mesentérica activa principalmente los receptor α_{1A} y α_{1D} lo que produce una potente vasoconstricción (247). Con casi el 25% del gasto cardíaco dirigido al intestino, la rica inervación simpática de los vasos mesentéricos (235, 248, 249) puede producir una potente contracción que le permite movilizar la sangre del territorio esplácnico a otras áreas del cuerpo para mantener la homeostasis cardiovascular en situaciones fisiológicas como el ejercicio físico (250, 251).

En la arteria mesentérica de ratón el sorafenib inhibió la contracción inducida por la noradrenalina. El lecho vascular mesentérico contribuye de manera

importante a la resistencia periférica total (252). Tanto las alteraciones estructurales como funcionales de los vasos mesentéricos alteran de forma importante la presión arterial (253-255). Por lo tanto, el sorafenib al inhibir la contracción adrenérgica en los pequeños vasos mesentéricos podría tener efectos relevantes sobre el control de la presión arterial.

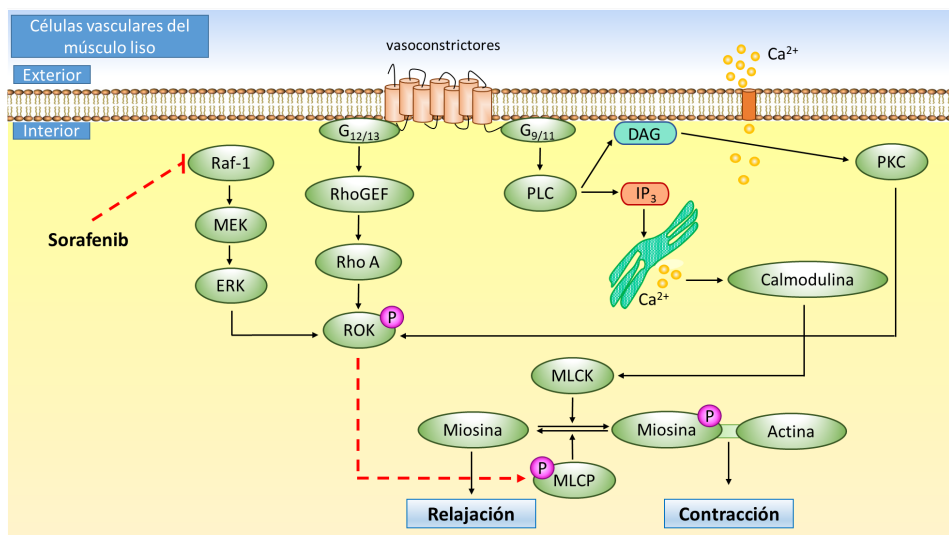


Figura 35. Esquema ilustrativo de los efectos del sorafenib sobre algunas vías que regulan la contracción de las células de músculo liso vascular. El sorafenib inhibe vías de señalización Raf/MEK/ERK y RhoA/ROK que llevan a una mayor actividad de la MLCP, una menor fosforilación de la MLC₂₀ y la relajación del músculo liso vascular.

Respuesta a la acetilcolina.

Para determinar si el sorafenib altera la respuesta relajante dependiente del endotelio se utilizó la acetilcolina, sustancia que activa los receptores muscarínicos localizados en el endotelio produciendo vasodilatación (107). Por lo tanto, la destrucción del endotelio comporta la desaparición de esta relajación. En la aorta y ramas de la arteria mesentérica de ratón la respuesta relajante a la

acetilcolina fue dependiente del endotelio y la eliminación mecánica del mismo inhibió por completo la respuesta relajante a la acetilcolina.

La unión de la acetilcolina a los receptores muscarínicos produce relajación (107) al activar la NOS e inducir la síntesis de NO (109). En la aorta de ratón la inhibición de la NOS suprimió la relajación dependiente del endotelio a la acetilcolina, indicando que la relajación está mediada por la activación de la NOS y la síntesis de NO. En aorta de ratón, el tratamiento con sorafenib disminuyó ligeramente la relajación dependiente de NO inducida por la acetilcolina.

Los niveles plasmáticos del VEGF están incrementados en pacientes con CHC (256) y estos niveles plasmáticos se han relacionado con la evolución y pronóstico de la enfermedad (20). El VEGF puede estimular al VEGFR2 de las células endoteliales donde favorece la entrada de Ca^{2+} dependiente de la PLC- γ y la activación de vía PKB/Akt que fosforila el residuo de serina en la posición 1179 de la eNOS, incrementando la síntesis de NO (33, 34).

Los efectos del sorafenib sobre la síntesis de NO en la aorta de ratón podrían ser debidos a que produce la inhibición de vías de señalización del VEGFR2 que están relacionadas con la síntesis de NO. Por una parte, el sorafenib inhibiría a la PLC- γ que provocaría unos menores niveles de Ca^{2+} citoplasmático en la célula endotelial, una menor formación del complejo Ca^{2+} -CaM y una menor actividad de la NOS. Por otra parte, el sorafenib inhibe a la PKB/Akt que disminuiría el nivel de fosforilación de la eNOS y reduciría su actividad (**Figura 36**).

En ratones modificados genéticamente que no expresan la eNOS, la acetilcolina induce relajación de la arteria mesentérica por un mecanismo independiente de

NO (257). Diversos estudios han puesto de manifiesto la persistencia de relajación a la acetilcolina después de la inhibición de la formación de PGI₂ y de NO, confirmando la existencia de un tercer factor relajante endotelial (258). Este factor produce hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso, por lo que se le ha denominado EDHF (259). Se ha descrito que la participación del EDHF en la relajación endotelio-dependiente es mayor a medida que disminuye el tamaño del vaso (260).

Los resultados en ramas de la arteria mesentérica de ratón han puesto de manifiesto que hay una escasa o nula participación de la PGI₂ en la respuesta a la acetilcolina. La inhibición de la COX enzima clave en la síntesis de PGI₂ no alteró la respuesta relajante a la acetilcolina. La inhibición de la NOS disminuyó ligeramente el efecto máximo a la acetilcolina indicando una pequeña participación del NO en dicha respuesta. Por último, se ha demostrado que la acetilcolina hiperpolariza las células endoteliales al incrementar la concentración extracelular de K⁺ (138). La relajación se asoció con la hiperpolarización de las células de músculo liso vascular a través de la activación de canales de K⁺ (139, 261). En ramas de arteria mesentérica, el bloqueo simultáneo de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ de pequeña, intermedia y gran conductancia inhibió la relajación a la acetilcolina. Estudios previos demostraron que el bloqueo de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ inhibe la hiperpolarización de las células de músculo liso y la relajación (139, 262).

En conjunto, los resultados en ramas de arteria mesentérica de ratón muestran que la relajación a la acetilcolina está mediada por el NO y en mayor medida por el EDHF a través de la activación de los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ poniendo de manifiesto los diferentes mecanismos que regulan la vasorrelajación dependiendo del lecho vascular considerado.

Los resultados indican que el sorafenib inhibe ligeramente la relajación dependiente del endotelio mediada por la acetilcolina, aunque no permiten indicar qué factor endotelial sería inhibido por el sorafenib. En aorta, el sorafenib inhibe la síntesis de NO, mientras que en la arteria mesentérica el sorafenib podría inhibir las mismas vías implicadas en la síntesis de NO, sin embargo, no se pueden descartar efectos del sorafenib sobre las vías de señalización del factor hiperpolarizante.

Respuesta al nitroprusiato sódico.

Con la finalidad de determinar si el sorafenib puede alterar la respuesta independiente de la presencia de endotelio, y mediada por el NO se estudió la relajación inducida por el nitroprusiato sódico. El nitroprusiato sódico relaja el músculo liso al liberar NO en las células musculares y por tanto la integridad del endotelio no es un factor determinante en sus efectos vasculares (120, 263).

El NO es una sustancia lipofílica, lo que le permite difundir fácilmente a través de la zona abluminal del endotelio hacia el músculo liso vascular e interactuar con el grupo hemo de la guanilato ciclasa soluble (sGC) para producir su activación (116). La activación de la sGC estimula la conversión de guanosín-5-trifosfato (GTP) a guanosín 3',5'cíclico monofosfato (GMPc). La acumulación de GMPc en la célula conduce a una cascada de acontecimientos cuyo resultado final es la disminución de la $[Ca^{2+}]_c$ y la relajación del músculo liso vascular (264). Estos mecanismos son los que utilizan compuestos cuya eficacia clínica se conoce desde hace tiempo como la nitroglicerina y el nitroprusiato sódico (nitrovasodilatadores).

La vía de señalización NO/cGMP tiene importantes efectos sobre el tono vascular, la permeabilidad de las células endoteliales, la agregación plaquetaria y la expresión génica (265), a través de la activación de la PKG (266), que mediante la reducción de la $[Ca^{2+}]_c$ y la reducción de la sensibilidad al Ca^{2+} induce la relajación del músculo liso vascular.

La vía NO/cGMP/PKG desencadena una reducción en la $[Ca^{2+}]_c$ a través de la fosforilación de varias proteínas clave, entre las que se encuentran canales iónicos, bombas iónicas, receptores y enzimas implicados en el control de la concentración de $[Ca^{2+}]_c$ (267). Entre estas proteínas se encuentran los canales de K^+ activados por Ca^{2+} que una vez fosforilados y activados provocan la salida de K^+ , la hiperpolarización la membrana celular y la inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, induciendo la relajación del músculo liso vascular (268-271). Por otra parte, la PKG puede fosforilar directamente los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje reduciendo la probabilidad de que el canal permanezca en su estado abierto, disminuyendo la $[Ca^{2+}]_c$, lo que conduce a la relajación del músculo liso (272). Otra proteína fosforilada por la PKG es la Ca^{2+} /ATPasa de la membrana plasmática, cuya actividad es uno de los mecanismos más importantes que provocan la salida del Ca^{2+} citosólico (273, 274), también fosforila al fosfolamban que incrementa la actividad de la Ca^{2+} /ATPasa del retículo sarcoplásmico (275), cuya activación es responsable del almacenamiento de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico, disminuyendo la $[Ca^{2+}]_c$ y por lo tanto relajando el músculo liso (276).

El segundo mecanismo por el que la vía NO/cGMP/PKG puede producir relajación del músculo liso vascular es por inducir la desensibilización al Ca^{2+} , aunque el mecanismo no está totalmente establecido y es diferente dependiendo del lecho vascular considerado, se han propuesto varias vías por la que se

produce la desensibilización al Ca^{2+} . Se ha demostrado que la vía NO/cGMP/PKG produciría desensibilización al Ca^{2+} a través de un aumento en la actividad de MLCP sin afectar la actividad de MLCK. Este cambio en el equilibrio MLCK/MLCP produciría una disminución neta en la fosforilación de MLC_{20} y, por lo tanto, una reducción en la sensibilidad del sistema contráctil al Ca^{2+} , que induciría relajación del músculo liso (277, 278).

También se ha demostrado que la vía NO/GMPc/PKG puede producir desensibilización al Ca^{2+} a través de la inhibición de la actividad de la PKC. La PKC puede fosforilar directa o indirectamente a la caldesmona (279, 280), una proteína reguladora que en su estado no fosforilado inhibe la interacción de la actina con la miosina. Además, la inhibición de la PKC puede inducir la activación de la MLCP (281) y la relajación del músculo liso vascular.

En la aorta y en la arteria mesentérica de ratón el nitroprusiato sódico mediante la activación de la vía NO/GMPc/PKG indujo una potente relajación. El sorafenib no modificó la respuesta relajante inducida por el nitroprusiato sódico, indicando que el sorafenib no tiene efectos significativos sobre la vía NO/GMPc/PKG. Puesto que el sorafenib y la vía NO/GMPc/PKG afectan a mecanismos contráctiles del músculo liso que disminuyen la sensibilidad al Ca^{2+} mediante la inhibición de diversas proteínas, sus efectos podrían verse reducidos o incrementados. Los resultados indican que no hay interacción entre las vías de relajación inducidas por el sorafenib y las activadas por el nitroprusiato sódico.

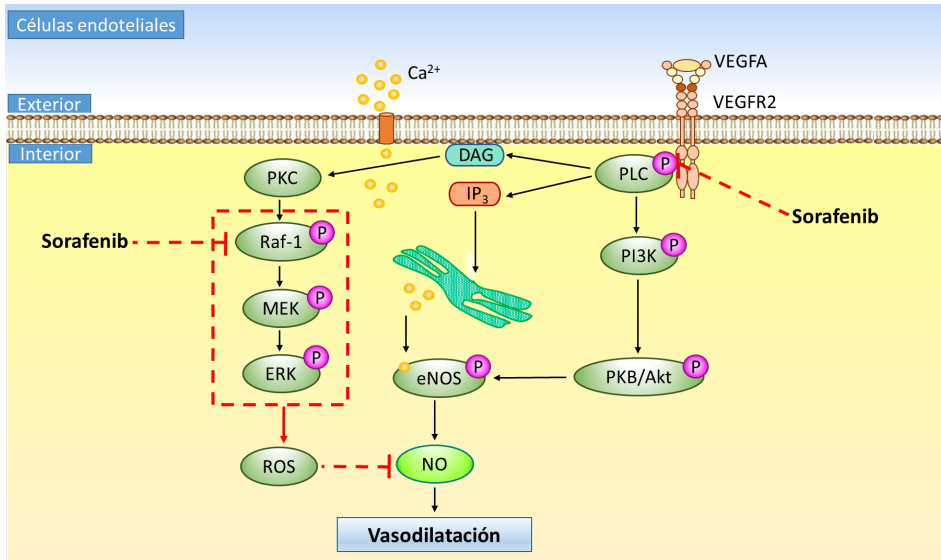


Figura 36. Esquema ilustrativo de los efectos del sorafenib sobre la biodisponibilidad del NO en el endotelio vascular. El sorafenib inhibe la actividad quinasa del receptor VEGFR2 y Raf-1, inhibiendo por una parte la vía PI3K/Akt/PKB que fosforila la eNOS incrementando la síntesis de NO, y por otra la inhibición de la PLC inhibe la formación de IP₃ y la liberación de Ca²⁺ que forma el complejo Ca²⁺-calmodulina que activa la eNOS. Finalmente, la inhibición de la vía Raf/MEK/ERK conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden reaccionar con el NO, disminuyendo su biodisponibilidad.

Varios fármacos quimioterapéuticos ejercen sus efectos citotóxicos a través de la generación de ROS (153). El sorafenib inhibe la vía MEK/ERK, una vía que controla la producción de ROS en el CHC, se ha descrito que uno de los mecanismos por los que el sorafenib podría ejercer sus efectos citotóxicos es la restauración de la susceptibilidad de las células tumorales del CHC a la lisis inducida por las ROS (63).

Se ha demostrado que el sorafenib induce la formación de O_2^- en las células tumorales del CHC (63). Es probable que este efecto del sorafenib en células del CHC también se produzca en la pared vascular. En la aorta de ratón, la presencia de sorafenib incrementó los niveles de O_2^- de forma dependiente de la concentración, un efecto que es revertido por el Tempol, un mimético de la superóxido dismutasa que reacciona con el O_2^- inactivándolo (159). La producción de O_2^- inducido por el sorafenib podría ser otro mecanismo que podría contribuir a la disminución de la biodisponibilidad de NO en los anillos de aorta de ratón tratados con sorafenib. Se ha demostrado que el O_2^- reacciona con el NO para producir peroxinitrito, provocando vasoconstricción (282, 283). La vasoconstricción resultante de la activación de algunos receptores acoplados a la proteína G depende parcialmente de la generación de ROS, particularmente el O_2^- , contracción que puede ser atenuada por el Tempol (284-286). La contracción inducida por el O_2^- puede ser el resultado de la activación directa de vías de excitación-contracción del músculo liso vascular (287), indirectamente a través de la inactivación del NO (286, 288-290) o una combinación de ambas acciones (285, 291, 292).

El TxA_2 , mediante el estímulo del receptor de TP induce la producción de O_2^- en células endoteliales (293) y en anillos aórticos de ratón (294). El sorafenib podría favorecer la producción de O_2^- inducida por otros agentes como el TxA_2 mediante la activación del receptor TP. Los resultados confirman que la activación del receptor TP produce un incremento de la producción de O_2^- y muestran que la presencia de sorafenib no altera la producción de O_2^- inducido por el TxA_2 , sugiriendo que el sorafenib y el TxA_2 utilizan las mismas vías que participan en la formación de O_2^- .

Justificación de los lechos vasculares utilizados.

En el presente trabajo hemos estudiado los efectos del sorafenib en la aorta y la arteria mesentérica de ratón. El lecho vascular mesentérico contribuye de forma considerable a la resistencia arterial sistémica y el tono de este lecho vascular es uno de los factores más importantes que controlan la presión arterial. Es por ello, que la utilización de pequeñas ramas de la arteria mesentérica, permite investigar los efectos del sorafenib sobre los vasos que contribuyen directamente al control de la presión arterial. La aorta se eligió como modelo de vaso grande y de conductancia, y comparando las respuestas vasculares frente a vasos de resistencia. Se ha demostrado que la reactividad vascular puede ser diferente según el lecho vascular y el calibre del vaso considerado.

Los experimentos realizados en aorta se realizaron en paralelo con los experimentos en pequeñas arterias mesentéricas, procedentes de los mismos animales y permitieron la comparación directa dentro de un mismo animal de los efectos del sorafenib sobre los mecanismos de contracción y relajación inducidos por diversos agonistas.

Los efectos del sorafenib sobre el tono vascular en la aorta son similares a los observados en la arteria mesentérica. El sorafenib inhibe la relajación dependiente del endotelio propiciando un incremento del tono vascular que conduciría a un incremento del tono vascular. Sin embargo, el sorafenib también tiene importantes efectos sobre la contracción vascular, tanto la inducida por los mecanismos independientes de la activación de receptor, como la despolarización de la membrana celular y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Además, también inhibe la contracción del músculo liso inducida por potentes agentes vasconstrictores como el U46619, un análogo estable del TxA_2 que induce contracción por activación de receptores y vías

específicas de contracción. También inhibe la contracción inducida por la serotonina y la noradrenalina, factores que participan de forma importante en el control del tono del músculo liso vascular.

Implicaciones clínicas.

Los resultados presentados demuestran que el sorafenib actúa sobre varias vías de señalización tanto en vasos de conductancia como en pequeños vasos arteriales. El hecho de que el sorafenib inhiba la contracción mediada por la entrada de Ca^{2+} extracelular y la inducida por la sensibilización al Ca^{2+} , permite avanzar que el tratamiento con sorafenib podría producir importantes alteraciones hemodinámicas en la circulación sistémica, y resalta la importancia de comprender los mecanismos moleculares que subyacen en los efectos del sorafenib. Además, el sorafenib puede inhibir la síntesis de NO pero no altera la vía NO/GMPc/PKG que induce relajación del músculo liso vascular. La disminución de la biodisponibilidad del NO induciría disfunción endotelial que podría tener importantes efectos negativos. Otros estudios son necesarios para investigar los efectos del sorafenib en preparaciones de vasos humanos aislados para determinar directamente si estos hallazgos son traducibles al entorno clínico.

Diversos estudios indican que la eficacia del sorafenib depende de la dosis administrada (52). La pauta inicial de administración del sorafenib es de dos comprimidos (400 mg) cada 12 horas (295). El sorafenib se absorbe rápidamente tras la administración oral y sufre circulación enterohepática; su vida media es de entre 25 y 48 horas. La metabolización del sorafenib se produce principalmente en el hígado a través de la oxidación y la glucuronidación. En cuanto a los niveles plasmáticos del sorafenib en pacientes con CHC hay que

tener en cuenta que la incidencia de CHC se asocia a cirrosis e insuficiencia hepática, que podrían alterar significativamente la eliminación del fármaco, alterar las concentraciones plasmáticas y sus efectos en el paciente (296). La concentración plasmática de sorafenib en pacientes con CHC avanzado es aproximadamente 10^{-6} M pero en ocasiones pueden producirse picos de hasta 10^{-5} M (296). Los efectos del sorafenib obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del rango terapéutico del fármaco y podrían inducir una disminución de la contracción en algunos vasos acompañada de una menor producción de NO, estos efectos vasculares podrían explicar algunos de los efectos secundarios observados en el paciente.

Los efectos secundarios que afectan al sistema cardiovascular varían a lo largo del tratamiento con sorafenib. Durante las primeras semanas puede observarse un aumento de la presión arterial, en general leve y de fácil manejo (67). En un 10-15% de los casos se ha observado hipertensión. A pesar de que la presencia de isquemia cardiaca o infarto en el estudio SHARP fue similar en los pacientes que recibían placebo o sorafenib (1 vs. 3%) (50), se recomienda control de síntomas sugestivos de cardiopatía isquémica. Los resultados demuestran que el sorafenib puede actuar sobre el endotelio y los factores relajantes derivados del mismo, induciendo una disminución de la biodisponibilidad del NO que podría provocar, al menos en parte, la aparición de estos efectos secundarios sobre los vasos. La inhibición de la vía del VEGF conduce a una reducción de la biodisponibilidad del NO que causaría una disminución de la permeabilidad endotelial y vasoconstricción resultando en un incremento de la resistencia sistémica periférica de los vasos sanguíneos, el cual provoca un incremento en la presión sanguínea (297). Diferentes estudios indican que la hipertensión es un efecto adverso producido por el tratamiento con sorafenib (297, 298), sin embargo un estudio reciente (297) demuestra que la frecuencia con la que

aparece hipertensión en pacientes tratados con sorafenib es más baja que la de pacientes tratados con otros inhibidores tirosina quinasa (297), probablemente sea debido a que el sorafenib además de inhibir la síntesis de NO, también inhibe la contracción inducida por el estímulo simpático y la de otros potentes factores contráctiles. Por el momento se desconoce qué mecanismos tendrían más relevancia en el control del tono vascular *in vivo* y en qué situaciones fisiológicas o fisiopatológicas pueden hacer que prevalezcan los efectos que disminuyen la biodisponibilidad de NO (contracción) o los que disminuyen la contracción independiente y dependiente de la activación de receptor (relajación).

Limitaciones del estudio.

Hay varias limitaciones que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados de esta tesis. En primer lugar, se han utilizado preparaciones arteriales aisladas de ratones; si estos estudios son extrapolables a humanos aún no se ha determinado. Por otra parte, la regulación neurohumoral, presente en el organismo, está ausente en el vaso aislado, por este motivo, cualquier experimento *in vitro* relacionado con la respuesta vascular debe ser valorado con cautela cuando se intenta extrapolar a la situación *in vivo*. Los mecanismos de adaptación que pueden aparecer *in vivo* sólo pueden vislumbrarse en el vaso aislado como manifestaciones circunscritas al órgano efector que es la propia pared vascular. Sin embargo, el estudio de la respuesta del órgano efector continúa siendo uno de los objetivos primordiales para conocer los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones vasculares inducidos de forma individualizada por agonistas o fármacos como el sorafenib. Precisamente la presencia de reflejos y otras adaptaciones cardiovasculares *in vivo* constituye casi siempre una limitación cuando se quiere valorar la respuesta del órgano

efector de forma experimental más aún cuando se pretende estudiar los efectos de fármacos o sustancias que afectan diversos órganos de forma simultánea y coordinada.

A la hora de interpretar estos resultados hay que tener en cuenta que los vasos utilizados proceden de ratones sanos, donde los niveles de VEGF y la señalización del VEGFR2 son poco relevantes en el funcionamiento del vaso. Sin embargo, en los vasos afectados por el CHC, los elevados niveles de VEGF y activación del VEGFR2 puedan tener efectos importantes sobre la regulación del tono vascular alterando tanto la contracción como la biodisponibilidad del NO en los mismos.

Los efectos celulares del sorafenib están mediados por la inhibición de distintos receptores tirosina quinasa que regulan distintas vías de señalización intracelular. Estos efectos podrían involucrar cambios en la expresión génica que requieren necesariamente un periodo de tiempo para la síntesis de proteínas y para poner de manifiesto la respuesta biológica. Por el contrario, la rapidez con que el sorafenib disminuye la contracción del músculo liso, así como la rapidez con que produce la relajación vascular, similar a la de otros agentes vasorrelajantes, sugiere que en los efectos del sorafenib que se han descrito, no participarían mecanismos de transcripción génica.

Conclusiones

Los resultados presentados permiten concluir que:

1. El sorafenib, a concentraciones similares a las que se pueden encontrar en el plasma de pacientes con CHC, inhibe los mecanismos de contracción del músculo liso vascular activados por la entrada de Ca^{2+} extracelular.
2. La sensibilización al Ca^{2+} del músculo liso inducida por la activación de receptores acoplados a proteínas G como el tromboxano A_2 , serotonina y noradrenalina es inhibida por el sorafenib. Los mecanismos contráctiles que implican sensibilización al Ca^{2+} son más sensibles a los efectos del sorafenib que aquellos dependientes de la entrada de Ca^{2+} extracelular.
3. El sorafenib inhibe la síntesis de NO endotelial disminuyendo la capacidad relajante dependiente del endotelio. Debido al importante papel que desempeña el NO en la función de la pared vascular, esta disfunción endotelial asociada al tratamiento con sorafenib ayudaría a interpretar algunos de los efectos secundarios vasculares del fármaco en pacientes con CHC avanzado.
4. Los mecanismos de relajación del músculo liso inducidos por el nitroprusiato sódico, un dador de NO que induce relajación del músculo liso independientemente de la presencia de endotelio, no son alterados por el sorafenib, descartando efectos sobre el mecanismo de relajación del músculo liso mediados por la activación de la vía NO/GMPc/PKG.
5. El sorafenib incrementa los niveles de anión superóxido en la pared vascular, sin interferir con la producción de anión superóxido inducida por la activación del receptor TP.

6. Los mecanismos contráctiles y relajantes que controlan el tono vascular y que son diana del sorafenib, son igualmente afectados en la aorta y en la arteria mesentérica de ratón.

Bibliografía

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2(9):533-43.
2. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S35-50.
3. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2557-76.
4. Ghouri YA, Mian I, Rowe JH. Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. *J Carcinog.* 2017;16:1.
5. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31(4):339-46.
6. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003;362(9399):1907-17.
7. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):329-38.
8. Siegel AB, Olsen SK, Magun A, Brown RS, Jr. Sorafenib: where do we go from here? *Hepatology.* 2010;52(1):360-9.
9. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal.* 2007;19(10):2003-12.
10. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(14):7192-7.
11. Potgens AJ, Lubsen NH, van Altena MC, Vermeulen R, Bakker A, Schoenmakers JG, et al. Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J Biol Chem.* 1994;269(52):32879-85.
12. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor family

- genes: when did the three genes phylogenetically segregate? *Biol Chem.* 2002;383(10):1573-9.
13. Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem.* 2002;85(2):357-68.
 14. Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):579-91.
 15. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 1992;3(2):211-20.
 16. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(18):11197-204.
 17. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31283-8.
 18. Ruch C, Skiniotis G, Steinmetz MO, Walz T, Ballmer-Hofer K. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):249-50.
 19. Russell RB, Breed J, Barton GJ. Conservation analysis and structure prediction of the SH2 family of phosphotyrosine binding domains. *FEBS Lett.* 1992;304(1):15-20.
 20. Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, et al. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2014;120(2):229-37.
 21. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991;6(9):1677-83.

22. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1995;55(23):5687-92.
23. Aragon-Ching JB, Dahut WL. VEGF inhibitors and prostate cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol.* 2009;2(2):161-8.
24. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-78.
25. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem.* 2004;279(21):22267-75.
26. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002;296(5573):1655-7.
27. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96(6):857-68.
28. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318-21.
29. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30336-43.
30. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;264(3):781-8.
31. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak

- HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-5.
32. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2604-9.
33. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-5.
34. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.
35. Li B, Ogasawara AK, Yang R, Wei W, He GW, Zioncheck TF, et al. KDR (VEGF receptor 2) is the major mediator for the hypotensive effect of VEGF. *Hypertension*. 2002;39(6):1095-100.
36. Glicki G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺. *Biochem J*. 2001;353(Pt 3):503-12.
37. Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett*. 1997;420(1):28-32.
38. Welker MW, Trojan J. Antiangiogenic treatment in hepatocellular carcinoma: the balance of efficacy and safety. *Cancer Manag Res*. 2013;5:337-47.
39. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Yamazaki M, Kikukawa M, Tsujinoue H, et al. Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 1998;28(6):1489-96.

40. Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol.* 2003;16(6):552-7.
41. Bottsford-Miller JN, Coleman RL, Sood AK. Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies. *J Clin Oncol.* 2012;30(32):4026-34.
42. Fernandez M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol.* 2009;50(3):604-20.
43. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 1993;53(23):5822-7.
44. Fine BA, Valente PT, Feinstein GI, Dey T. VEGF, flt-1, and KDR/flk-1 as prognostic indicators in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2000;76(1):33-9.
45. Fournier E, Birnbaum D, Borg JP. [Receptors for factors of the VEGF (Vascular Endothelial Growth Family)]. *Bull Cancer.* 1997;84(4):397-405.
46. Folkman J. Angiogenesis research: from laboratory to clinic. *Forum (Genova).* 1999;9(3 Suppl 3):59-62.
47. Roskoski R, Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375(3):287-91.
48. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-6.
49. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;333(2):328-35.
50. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359(4):378-90.
51. Awada A, Hendlisz A, Gil T, Bartholomeus S, Mano M, de

- Valeriola D, et al. Phase I safety and pharmacokinetics of BAY 43-9006 administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumours. *Br J Cancer*. 2005;92(10):1855-61.
52. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res*. 2006;66(24):11851-8.
53. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8(3):219-25.
54. Sridhar SS, Hedley D, Siu LL. Raf kinase as a target for anticancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(4):677-85.
55. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *J Clin Oncol*. 2005;23(5):965-72.
56. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(19):7099-109.
57. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncione G, Wilhelm SM, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(5):326-34.
58. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394(6692):485-90.
59. Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, et al. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):2992-8.
60. Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee AAftSoLD.

- Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005;42(5):1208-36.
61. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006. p. 835-44.
 62. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(1):54-8.
 63. Coriat R, Nicco C, Chereau C, Mir O, Alexandre J, Ropert S, et al. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(10):2284-93.
 64. Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, et al. Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J*. 1991;10(7):1723-32.
 65. Choi SI, Jeong CS, Cho SY, Lee YS. Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase. *Arch Pharm Res*. 2007;30(10):1328-35.
 66. Mirzoeva S, Kim ND, Chiu K, Franzen CA, Bergan RC, Pelling JC. Inhibition of HIF-1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3-M cells. *Mol Carcinog*. 2008;47(9):686-700.
 67. Reig M, Matilla A, Bustamante J, Castells L, de La Mata M, Delgado M, et al. [Recommendations for the management of Sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma]. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;33(10):741-52.
 68. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008;586(21):5047-61.
 69. He WQ, Peng YJ, Zhang WC, Lv N, Tang J, Chen C, et al. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility in mice. *Gastroenterology*.

- 2008;135(2):610-20.
70. Isotani E, Zhi G, Lau KS, Huang J, Mizuno Y, Persechini A, et al. Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(16):6279-84.
 71. Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:593-620.
 72. Somlyo AP. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res*. 1985;57(4):497-507.
 73. van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ in smooth muscle. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:315-29.
 74. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. 1994;372(6503):231-6.
 75. Hartshorne DJ, Ito M, Erdodi F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. *J Biol Chem*. 2004;279(36):37211-4.
 76. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*. 2004;259(1-2):197-209.
 77. Arner A, Pfitzer G. Regulation of cross-bridge cycling by Ca^{2+} in smooth muscle. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;134:63-146.
 78. Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2165-80.
 79. Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;91(1):497-503.
 80. Xiao M, Reifenberger JG, Wells AL, Baldacchino C, Chen LQ, Ge P, et al. An actin-dependent conformational change in myosin. *Nat Struct Biol*. 2003;10(5):402-8.
 81. Hess P, Lansman JB, Tsien RW. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and

- antagonists. *Nature*. 1984;311(5986):538-44.
82. Bolton TB, Lim SP, Salmon DM, Beech DJ. Calcium channels and calcium-mediated effects in smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12 Suppl 5:S96-9.
 83. Henry PD. Comparative pharmacology of calcium antagonists: nifedipine, verapamil and diltiazem. *Am J Cardiol*. 1980;46(6):1047-58.
 84. Meredith PA, Elliott HL. Dihydropyridine calcium channel blockers: basic pharmacological similarities but fundamental therapeutic differences. *J Hypertens*. 2004;22(9):1641-8.
 85. Schaub MC, Kunz B. Regulation of contraction in cardiac and smooth muscles. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1986;8 Suppl 8:S117-23.
 86. Abdel-Latif AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol Rev*. 1986;38(3):227-72.
 87. Lucchesi BR. Role of calcium on excitation-contraction coupling in cardiac and vascular smooth muscle. *Circulation*. 1989;80(6 Suppl):IV1-13.
 88. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990;259(1 Pt 1):C3-18.
 89. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, et al. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*. 1986;234(4783):1519-26.
 90. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. 1986;233(4761):305-12.
 91. Morgan JP, Morgan KG. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J Physiol*. 1984;351:155-67.
 92. Karaki H. Ca²⁺ localization and sensitivity in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(8):320-5.
 93. Kitazawa T, Masuo M, Somlyo AP. G protein-mediated inhibition

- of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(20):9307-10.
94. Somlyo AP, Kitazawa T, Himpens B, Matthijs G, Horiuti K, Kobahashi S, et al. Modulation of Ca²⁺-sensitivity and of the time course of contraction in smooth muscle: A major role of protein phosphatases? *Adv Prot Phosphatases*. 1989;5:181-95.
 95. Gong MC, Iizuka K, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, et al. Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca²⁺ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(3):1340-5.
 96. Kokubu N, Satoh M, Takayanagi I. Involvement of botulinum C3-sensitive GTP-binding proteins in alpha 1-adrenoceptor subtypes mediating Ca(2+)-sensitization. *Eur J Pharmacol*. 1995;290(1):19-27.
 97. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-9.
 98. Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, et al. Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J*. 1996;15(9):2208-16.
 99. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S, Kaibuchi K, Matsuura Y, et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*. 1992;267(13):8719-22.
 100. Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, et al. Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett*. 1995;367(3):246-50.
 101. Ichikawa K, Ito M, Hartshorne DJ. Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem*. 1996;271(9):4733-40.
 102. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, et

- al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 1996;273(5272):245-8.
103. Sward K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca²⁺ sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol*. 2000;522 Pt 1:33-49.
104. Trinkle-Mulcahy L, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Siegman MJ, Butler TM. Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle. *J Biol Chem*. 1995;270(31):18191-4.
105. Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y, et al. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res*. 932003. p. 548-56.
106. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-42.
107. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
108. Cocks TM, Angus JA, Campbell JH, Campbell GR. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J Cell Physiol*. 1985;123(3):310-20.
109. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
110. Moncada S, Radomski MW, Palmer RM. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(13):2495-501.
111. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-6.

112. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
113. Moncada S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J Lab Clin Med.* 1992;120(2):187-91.
114. Fukumura D, Jain RK. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(1):77-89.
115. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 1996;33(3):181-94.
116. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res.* 1989;65(1):1-21.
117. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(8):3203-7.
118. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 1994;368(6474):850-3.
119. Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation.* 1995;92(11):3337-49.
120. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218(3):739-49.
121. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1977;3(1):23-35.
122. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ,

- Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1979;5(3):211-24.
123. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:171-91.
124. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976;263(5579):663-5.
125. Piper P, Vane J. The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 1971;180:363-85.
126. Blajchman MA, Senyi AF, Hirsh J, Surya Y, Buchanan M, Mustard JF. Shortening of the bleeding time in rabbits by hydrocortisone caused by inhibition of prostacyclin generation by the vessel wall. *J Clin Invest.* 1979;63(5):1026-35.
127. Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature.* 1979;278(5703):456-9.
128. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990;323(1):27-36.
129. Tateson JE, Moncada S, Vane JR. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins.* 1977;13(3):389-97.
130. Komori K, Suzuki H. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ Res.* 1987;61(4):586-93.
131. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.* 1996;78(3):415-23.
132. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries.

- Nature. 1999;401(6752):493-7.
133. Popp R, Brandes RP, Ott G, Busse R, Fleming I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. *Circ Res*. 2002;90(7):800-6.
 134. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(3):909-13.
 135. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, et al. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation*. 2003;107(7):1040-5.
 136. Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, et al. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;229(1):114-20.
 137. Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A, Hobbs AJ. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):1426-31.
 138. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 1998;396(6708):269-72.
 139. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23(8):374-80.
 140. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332(6163):411-5.
 141. Kiowski W, Luscher TF, Linder L, Buhler FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*. 1991;83(2):469-75.
 142. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide

- and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004;62(6):505-15.
143. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986;320(6061):454-6.
 144. Pieper GM, Gross GJ. Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol.* 1988;255(4 Pt 2):H825-33.
 145. Rubanyi GM. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med.* 1988;4(2):107-20.
 146. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol.* 1992;263(2 Pt 2):H321-6.
 147. Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: modulator of cardiovascular function. 1990.
 148. Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature.* 1967;216(5117):762-6.
 149. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003;9(6):669-76.
 150. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 1993;265(2 Pt 2):H586-92.
 151. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18(1):4-25.
 152. Govers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(2):F193-206.
 153. Alexandre J, Batteux F, Nicco C, Chereau C, Laurent A, Guillevin L, et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2006;119(1):41-8.
 154. Aitken K, Bagl DJ. Stretch-induced bladder smooth muscle cell (SMC) proliferation is mediated by RHAMM-dependent

- extracellular-regulated kinase (erk) signaling. *Urology*. 2001;57(6 Suppl 1):109.
155. Kavurma MM, Khachigian LM. ERK, JNK, and p38 MAP kinases differentially regulate proliferation and migration of phenotypically distinct smooth muscle cell subtypes. *J Cell Biochem*. 2003;89(2):289-300.
156. Furchgott RF. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984;24:175-97.
157. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990;101(3):746-52.
158. Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*. 2006;57 Suppl 5:113-24.
159. Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):418-69.
160. Wellman GC. Ion channels and calcium signaling in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*. 2006;28(7):690-702.
161. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol*. 2000;57(5):976-83.
162. Brugnara C, Armsby CC, De Franceschi L, Crest M, Euclaire MF, Alper SL. Ca(2+)-activated K⁺ channels of human and rabbit erythrocytes display distinctive patterns of inhibition by venom peptide toxins. *J Membr Biol*. 1995;147(1):71-82.
163. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1985;313(6000):316-8.
164. Blatz AL, Magleby KL. Single apamin-blocked Ca-activated K⁺ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. *Nature*. 1986;323(6090):718-20.

165. Chang YS, Adnane J, Trail PA, Levy J, Henderson A, Xue D, et al. Sorafenib (BAY 43-9006) inhibits tumor growth and vascularization and induces tumor apoptosis and hypoxia in RCC xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;59(5):561-74.
166. Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, et al. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1117-28.
167. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1998;27(4):951-8.
168. Semela D, Dufour JF. Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2004;41(5):864-80.
169. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2007;27(1):55-76.
170. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Koubsky K, Ito M, Ota H, et al. Tyrosine kinase inhibitors are potent acute pulmonary vasodilators in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(4):804-8.
171. Biers SM, Reynard JM, Doore T, Brading AF. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int.* 2006;97(3):612-6.
172. Kubota Y, Biers SM, Kohri K, Brading AF. Effects of imatinib mesylate (Glivec) as a c-kit tyrosine kinase inhibitor in the guinea-pig urinary bladder. *Neurourol Urodyn.* 2006;25(3):205-10.
173. Ozgur-Akdemir A, Demirturk K, Karabakan M, Volkan-Oztekin C, Abdulkadir NA, Cetinkaya M, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) as protein-tyrosine kinase inhibitor elicits smooth muscle relaxation in isolated human prostatic tissue. *Urology.* 2011;78(4):968 e1-6.
174. Knock GA, Shaifta Y, Snetkov VA, Vowles B, Drndarski S, Ward JP, et al. Interaction between src family kinases and rho-kinase in agonist-induced Ca²⁺-sensitization of rat pulmonary artery. *Cardiovasc Res.* 2008;77(3):570-9.

175. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-4.
176. Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)*. 2009;24:342-56.
177. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1325-58.
178. Haluska FG, Tsujimoto Y, Russo G, Isobe M, Croce CM. Molecular genetics of lymphoid tumorigenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1989;36:269-80.
179. Arita H, Nakano T, Hanasaki K. Thromboxane A₂: its generation and role in platelet activation. *Prog Lipid Res*. 1989;28(4):273-301.
180. Armstrong RA, Wilson NH. Aspects of the thromboxane receptor system. *Gen Pharmacol*. 1995;26(3):463-72.
181. Makita Y. Effects of prostaglandin I₂ and carbocyclic thromboxane A₂ on smooth muscle cells and neuromuscular transmission in the guinea-pig mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 1983;78(3):517-27.
182. Nakahata N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther*. 2008;118(1):18-35.
183. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(8):2994-8.
184. Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature*. 1976;261(5561):558-60.
185. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary

- hypertension. *N Engl J Med.* 1992;327(2):70-5.
186. Giannarelli C, Zafar MU, Badimon JJ. Prostanoid and TP-receptors in atherothrombosis: is there a role for their antagonism? *Thromb Haemost.* 2010;104(5):949-54.
 187. Zamora CA, Baron DA, Heffner JE. Thromboxane contributes to pulmonary hypertension in ischemia-reperfusion lung injury. *J Appl Physiol (1985).* 1993;74(1):224-9.
 188. Sueda S, Kohno H, Inoue K, Fukuda H, Suzuki J, Watanabe K, et al. Intracoronary administration of a thromboxane A2 synthase inhibitor relieves acetylcholine-induced coronary spasm. *Circ J.* 2002;66(9):826-30.
 189. Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP. Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J.* 2005;389(Pt 3):763-74.
 190. Hirata T, Ushikubi F, Kakizuka A, Okuma M, Narumiya S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg60 to Leu mutation. *J Clin Invest.* 1996;97(4):949-56.
 191. Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281(2):957-64.
 192. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(2):504-8.
 193. Offermanns S, Simon MI. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem.* 1995;270(25):15175-80.
 194. Moers A, Wettschureck N, Gruner S, Nieswandt B, Offermanns S. Unresponsiveness of platelets lacking both Galpha(q) and

- Galpha(13). Implications for collagen-induced platelet activation. *J Biol Chem.* 2004;279(44):45354-9.
195. Shenker A, Goldsmith P, Unson CG, Spiegel AM. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. *Trans Assoc Am Physicians.* 1991;104:11-20.
196. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984;312(5992):315-21.
197. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* 1984;225(4668):1365-70.
198. Ushikubi F, Nakamura K, Narumiya S. Functional reconstitution of platelet thromboxane A2 receptors with Gq and Gi2 in phospholipid vesicles. *Mol Pharmacol.* 1994;46(5):808-16.
199. Muck S, Weber AA, Meyer-Kirchrath J, Schror K. The bovine thromboxane A2 receptor: molecular cloning, expression, and functional characterization. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998;357(1):10-6.
200. Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, et al. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science.* 1998;280(5372):2109-11.
201. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004;116(2):167-79.
202. Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:459-86.
203. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70(3):401-10.
204. Alapati VR, McKenzie C, Blair A, Kenny D, MacDonald A, Shaw AM. Mechanisms of U46619- and 5-HT-induced contraction of bovine pulmonary arteries: role of chloride ions. *Br J Pharmacol.* 2007;151(8):1224-34.

205. McKenzie C, MacDonald A, Shaw AM. Mechanisms of U46619-induced contraction of rat pulmonary arteries in the presence and absence of the endothelium. *Br J Pharmacol.* 2009;157(4):581-96.
206. Ding X, Murray PA. Cellular mechanisms of thromboxane A₂-mediated contraction in pulmonary veins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;289(5):L825-33.
207. Tosun M, Paul RJ, Rapoport RM. Role of extracellular Ca⁺⁺ influx via L-type and non-L-type Ca⁺⁺ channels in thromboxane A₂ receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(3):921-8.
208. Misfeldt MW, Aalkjaer C, Simonsen U, Bek T. Voltage-gated calcium channels are involved in the regulation of calcium oscillations in vascular smooth muscle cells from isolated porcine retinal arterioles. *Exp Eye Res.* 2010;91(1):69-75.
209. Snetkov VA, Knock GA, Baxter L, Thomas GD, Ward JP, Aaronson PI. Mechanisms of the prostaglandin F₂α-induced rise in [Ca²⁺]_i in rat intrapulmonary arteries. *J Physiol.* 2006;571(Pt 1):147-63.
210. Fukata M, Kaibuchi K. Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(12):887-97.
211. Hirano K, Hirano M, Kanaide H. Regulation of myosin phosphorylation and myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle. *J Smooth Muscle Res.* 2004;40(6):219-36.
212. Ghisdal P, Vandenberg G, Morel N. Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries. *J Physiol.* 2003;551(Pt 3):855-67.
213. Adnane L, Trail PA, Taylor I, Wilhelm SM. Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar), a dual-action inhibitor that targets RAF/MEK/ERK pathway in tumor cells and tyrosine kinases VEGFR/PDGFR in tumor vasculature. *Methods Enzymol.* 2006;407:597-612.
214. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(3):C661-8.

215. Hirano K. Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 2007;104(2):109-15.
216. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(2):H287-96.
217. Hennenberg M, Trebicka J, Sauerbruch T, Heller J. Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension. *Gut.* 2008;57(9):1300-14.
218. Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1984;65(3):305-11.
219. Segarra G, Cortina B, Mauricio MD, Novella S, Lluch P, Navarrete-Navarro J, et al. Effects of asymmetric dimethylarginine on renal arteries in portal hypertension and cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2016;22(48):10545-56.
220. Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, et al. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology.* 2006;130(3):838-54.
221. McKune CM, Watts SW. Characterization of the serotonin receptor mediating contraction in the mouse thoracic aorta and signal pathway coupling. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(1):88-95.
222. Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev.* 2008;108(5):1614-41.
223. Nagatomo T, Rashid M, Abul Muntasir H, Komiyama T. Functions of 5-HT_{2A} receptor and its antagonists in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther.* 2004;104(1):59-81.
224. Lin X, Huang XP, Chen G, Whaley R, Peng S, Wang Y, et al. Life beyond kinases: structure-based discovery of sorafenib as nanomolar antagonist of 5-HT receptors. *J Med Chem.* 2012;55(12):5749-59.
225. Weber A, Casini A, Heine A, Kuhn D, Supuran CT, Scozzafava A,

- et al. Unexpected nanomolar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2-selective celecoxib: new pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J Med Chem.* 2004;47(3):550-7.
226. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(7):493-502.
227. Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, et al. A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 2005;23(3):329-36.
228. Xie L, Wang J, Bourne PE. In silico elucidation of the molecular mechanism defining the adverse effect of selective estrogen receptor modulators. *PLoS Comput Biol.* 2007;3(11):e217.
229. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol.* 2007;25(2):197-206.
230. Yang L, Chen J, Shi L, Hudock MP, Wang K, He L. Identifying unexpected therapeutic targets via chemical-protein interactome. *PLoS One.* 2010;5(3):e9568.
231. Liu X, Ouyang S, Yu B, Liu Y, Huang K, Gong J, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W609-14.
232. Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta.* 2010;31(5):439-47.
233. Asada M, Ebihara S, Yamanda S, Niu K, Okazaki T, Sora I, et al. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia.* 2009;11(4):408-17.
234. Soll C, Jang JH, Riener MO, Moritz W, Wild PJ, Graf R, et al. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer.

- Hepatology. 2010;51(4):1244-54.
235. Furness JB, Marshall JM. Correlation of the directly observed responses of mesenteric vessels of the rat to nerve stimulation and noradrenaline with the distribution of adrenergic nerves. *J Physiol.* 1974;239(1):75-88.
236. Fleming BP, Barron KW, Howes TW, Smith JK. Response of the microcirculation in rat cremaster muscle to peripheral and central sympathetic stimulation. *Circ Res.* 1987;61(5 Pt 2):II26-31.
237. Chen XL, Rembold CM. Phenylephrine contracts rat tail artery by one electromechanical and three pharmacomechanical mechanisms. *Am J Physiol.* 1995;268(1 Pt 2):H74-81.
238. Minneman KP. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol Rev.* 1988;40(2):87-119.
239. Wu D, Katz A, Lee CH, Simon MI. Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem.* 1992;267(36):25798-802.
240. Perez DM, DeYoung MB, Graham RM. Coupling of expressed alpha 1B- and alpha 1D-adrenergic receptor to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol Pharmacol.* 1993;44(4):784-95.
241. Exton JH. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1212(1):26-42.
242. Gu H, Trajkovic S, LaBelle EF. Norepinephrine-induced phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipases D and C in rat tail artery. *Am J Physiol.* 1992;262(6 Pt 1):C1376-83.
243. Ruan Y, Kan H, Parmentier JH, Fatima S, Allen LF, Malik KU. Alpha-1A adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: inhibition by protein kinase A. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;284(2):576-85.
244. Mueed I, Bains P, Zhang L, Macleod KM. Differential participation of protein kinase C and Rho kinase in alpha 1-adrenoceptor

- mediated contraction in rat arteries. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004;82(10):895-902.
245. Kim SK, Avila JJ, Massett MP. Strain survey and genetic analysis of vasoreactivity in mouse aorta. *Physiol Genomics.* 2016;48(11):861-73.
246. Vandeputte C, Docherty JR. Modulation of contraction by alpha(2A/D)-adrenoceptors in mouse aorta: evidence employing knockout technology. *Br J Pharmacol.* 2002;135(5):1209-12.
247. Yamamoto Y, Koike K. alpha(1)-Adrenoceptor subtypes in the mouse mesenteric artery and abdominal aorta. *Br J Pharmacol.* 2001;134(5):1045-54.
248. Long JB, Segal SS. Quantifying perivascular sympathetic innervation: regional differences in male C57BL/6 mice at 3 and 20 months. *J Neurosci Methods.* 2009;184(1):124-8.
249. Haddock RE, Hill CE. Sympathetic overdrive in obesity involves purinergic hyperactivity in the resistance vasculature. *J Physiol.* 2011;589(Pt 13):3289-307.
250. Rowell LB. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol Rev.* 1974;54(1):75-159.
251. Flamm SD, Taki J, Moore R, Lewis SF, Keech F, Maltais F, et al. Redistribution of regional and organ blood volume and effect on cardiac function in relation to upright exercise intensity in healthy human subjects. *Circulation.* 1990;81(5):1550-9.
252. Christensen KL, Mulvany MJ. Mesenteric arcade arteries contribute substantially to vascular resistance in conscious rats. *J Vasc Res.* 1993;30(2):73-9.
253. Naito Y, Yoshida H, Konishi C, Ohara N. Differences in responses to norepinephrine and adenosine triphosphate in isolated, perfused mesenteric vascular beds between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32(5):807-18.
254. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension.* 1992;19(2 Suppl):III-9.

255. Tatchum-Talom R, Eyster KM, Martin DS. Sexual dimorphism in angiotensin II-induced hypertension and vascular alterations. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83(5):413-22.
256. Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X. Expression of plasma vascular endothelial growth factor in patients with hepatocellular carcinoma and effect of transcatheter arterial chemoembolization therapy on plasma vascular endothelial growth factor level. *World J Gastroenterol.* 2004;10(19):2878-82.
257. Waldron GJ, Ding H, Lovren F, Kubes P, Triggle CR. Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 1999;128(3):653-8.
258. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Nature of endothelium-derived relaxing factor: are there two relaxing mediators? *Circ Res.* 1987;61(5 Pt 2):II61-7.
259. Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988;95(4):1165-74.
260. Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2793-9.
261. Albillos A, Rossi I, Cacho G, Martinez MV, Millan I, Abreu L, et al. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am J Physiol.* 1995;268(3 Pt 1):G459-64.
262. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
263. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest.* 1986;78(1):1-5.
264. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12 Suppl 5:S115-8.
265. Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary

- Vascular Disease. *Am J Cardiol.* 2017;120(8S):S71-S9.
266. Feil R, Lohmann SM, de Jonge H, Walter U, Hofmann F. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ Res.* 2003;93(10):907-16.
267. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol.* 2000;184(3):409-20.
268. Kannan MS, Johnson DE. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. *Life Sci.* 1995;56(25):2229-38.
269. Trongvanichnam K, Mitsui-Saito M, Ozaki H, Karaki H. Effects of chronic oral administration of a high dose of nicorandil on in vitro contractility of rat arterial smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1996;314(1-2):83-90.
270. Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1996;270(3 Pt 1):L338-45.
271. Zhou XB, Ruth P, Schlossmann J, Hofmann F, Korth M. Protein phosphatase 2A is essential for the activation of Ca^{2+} -activated K^{+} currents by cGMP-dependent protein kinase in tracheal smooth muscle and Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996;271(33):19760-7.
272. Tewari K, Simard JM. Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca^{2+} channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1997;433(3):304-11.
273. Furukawa K, Tawada Y, Shigekawa M. Regulation of the plasma membrane Ca^{2+} pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1988;263(17):8058-65.
274. Rashatwar SS, Cornwell TL, Lincoln TM. Effects of 8-bromo-cGMP on Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca^{2+} -ATPase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):5685-9.

275. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991;40(6):923-31.
276. Clapp LH, Gurney AM. Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1991;418(5):462-70.
277. Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP. Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(3):658-63.
278. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.* 1997;272(8):5063-8.
279. Vorotnikov AV, Gusev NB, Hua S, Collins JH, Redwood CS, Marston SB. Phosphorylation of aorta caldesmon by endogenous proteolytic fragments of protein kinase C. *J Muscle Res Cell Motil.* 1994;15(1):37-48.
280. Walsh MP, Andrea JE, Allen BG, Clement-Chomienne O, Collins EM, Morgan KG. Smooth muscle protein kinase C. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994;72(11):1392-9.
281. Kitazawa T, Takizawa N, Ikebe M, Eto M. Reconstitution of protein kinase C-induced contractile Ca²⁺ sensitization in triton X-100-demembranated rabbit arterial smooth muscle. *J Physiol.* 1999;520 Pt 1:139-52.
282. Laight DW, Kaw AV, Carrier MJ, Anggard EE. Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol.* 1998;124(1):238-44.
283. Stuart-Smith K, Jeremy JY. Microvessel damage in acute respiratory distress syndrome: the answer may not be NO. *Br J Anaesth.* 2001;87(2):272-9.
284. Haque MZ, Majid DS. Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91PHOX subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension.* 2004;43(2):335-40.

285. Just A, Olson AJ, Whitten CL, Arendshorst WJ. Superoxide mediates acute renal vasoconstriction produced by angiotensin II and catecholamines by a mechanism independent of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(1):H83-92.
286. Lopez B, Salom MG, Arregui B, Valero F, Fenoy FJ. Role of superoxide in modulating the renal effects of angiotensin II. *Hypertension.* 2003;42(6):1150-6.
287. de Richelieu LT, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Salomonsson M. NO-independent mechanism mediates tempol-induced renal vasodilation in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(6):F1227-34.
288. Ichihara A, Hayashi M, Hirota N, Saruta T. Superoxide inhibits neuronal nitric oxide synthase influences on afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001;37(2 Pt 2):630-4.
289. Kopkan L, Huskova Z, Vanourkova Z, Thumova M, Skaroupkova P, Cervenka L, et al. Superoxide and its interaction with nitric oxide modulates renal function in prehypertensive Ren-2 transgenic rats. *J Hypertens.* 2007;25(11):2257-65.
290. Nishiyama A, Fukui T, Fujisawa Y, Rahman M, Tian RX, Kimura S, et al. Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats. *Hypertension.* 2001;37(1):77-83.
291. Just A, Whitten CL, Arendshorst WJ. Reactive oxygen species participate in acute renal vasoconstrictor responses induced by ETA and ETB receptors. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):F719-28.
292. Liu R, Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. Superoxide enhances tubuloglomerular feedback by constricting the afferent arteriole. *Kidney Int.* 2004;66(1):268-74.
293. Zhang M, Song P, Xu J, Zou MH. Activation of NAD(P)H oxidases by thromboxane A2 receptor uncouples endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):125-32.
294. Vidal-Gomez X, Novella S, Perez-Monzo I, Garabito M, Dantas

- AP, Segarra G, et al. Decreased bioavailability of nitric oxide in aorta from ovariectomized senescent mice. Role of cyclooxygenase. *Exp Gerontol.* 2016;76:1-8.
295. Imedio ER, Beveridge RD, Urtasun JA, Campos GB, Estelles DL, Esparcia MF, et al. Safety and efficacy of sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a single center experience. *Med Oncol.* 2014;31(5):948.
296. Strumberg D, Awada A, Hirte H, Clark JW, Seeber S, Piccart P, et al. Pooled safety analysis of BAY 43-9006 (sorafenib) monotherapy in patients with advanced solid tumours: Is rash associated with treatment outcome? *Eur J Cancer.* 2006;42(4):548-56.
297. Rini BI, Quinn DI, Baum M, Wood LS, Tarazi J, Rosbrook B, et al. Hypertension among patients with renal cell carcinoma receiving axitinib or sorafenib: analysis from the randomized phase III AXIS trial. *Target Oncol.* 2015;10(1):45-53.
298. Hamnvik OP, Choueiri TK, Turchin A, McKay RR, Goyal L, Davis M, et al. Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer.* 2015;121(2):311-9.