

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

Establecimiento de una metodología alternativa a la experimentación animal para la evaluación del potencial de sensibilización cutánea de los antineoplásicos Imatinib y Erlotinib.

Alumna: Anais Tomás Martínez

Tutora académica: Prof. Dra. Patricia Almuédver Folch

Cotutores externos: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Paula Montero Magalló

Curso Académico: 2020/2021

Valencia, Marzo 2021

Título

Establecimiento de una metodología alternativa a la experimentación animal para la evaluación del potencial de sensibilización cutánea de los antineoplásicos Imatinib y Erlotinib.

Resumen

Según la *United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS), se entiende que un compuesto químico es un sensibilizante cutáneo si es capaz de desencadenar una reacción alérgica cutánea al entrar en contacto con la piel. Se ha observado que no solo cosméticos o medicamentos de aplicación tópica producen este tipo de reacciones, sino que algunos fármacos de distribución sistémica también pueden llegar a producirlas. Dichas reacciones suelen caracterizarse por una serie de reacciones en cadena (AOP, *Adverse Outcome Pathway*), siendo la primera de ellas la unión covalente de un hapteno a una proteína transportadora de la piel dando como resultado un complejo que puede llegar a activar a los queratinocitos, y estos a su vez a las células dendríticas, o bien, activarlas directamente; desencadenándose en cualquier caso una respuesta inmune al producirse la activación de los linfocitos T en los nódulos linfáticos.

Normalmente la evaluación del potencial sensibilizante de cualquier compuesto era evaluado por procedimientos *in vivo*. Recientemente, con perspectivas de reducir al máximo la experimentación animal y, aprovechando esta serie de acontecimientos propios de las reacciones sensibilizantes cutáneas, se propone un procedimiento con el cual predecir el potencial sensibilizante de antineoplásicos, en este caso Erlotinib e Imatinib, empleando técnicas *in vitro* e *in chemico* ya aprobadas previamente para su uso en cosméticos por la OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). Para ello se analizarán ambos antineoplásicos. En primer lugar, mediante la técnica de DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*), se pretende medir la capacidad de los compuestos a testar de formar el complejo activante hapteno-proteína. Empleando un Test de ARE-Nrf2 Luciferasa, por cultivo *in vitro* de la línea celular KeratinoSens™, comprobar la activación de queratinocitos. Y por último, por citometría de flujo, mediante h-CLAT (*human- Cell Line Activation Test*), cuantificar la variación de la presencia de ciertos marcadores de membrana (CD86 y CD54) característicos de la activación de las células dendríticas.

Palabras clave

Sensibilización cutánea; antineoplásico; células dendríticas; monocitos; hapteno; DPRA; KeratinoSens™; h-CLAT; Erlotinib; Imatinib.

Estudiante, Autora del TFG: Anaïs Tomás Martínez

Tutora académica: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

Cotutores externos: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Paula Montero Magalló

Valencia, Marzo 2021

Title

Establishment of an alternative methodology to animal experimentation for the evaluation of the skin sensitization potential of the antineoplastic drugs Imatinib and Erlotinib.

Abstract

According to the *United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS), a chemical compound is understood as a skin sensitizer if it is capable to lead an allergic response following skin contact. It has been observed that not only cosmetics or medications with topical application could produce this kind of reactions, also other drugs with systemic distribution can do it too. These reactions usually are characterized by following an *Adverse Outcome Pathway* (AOP), being the first event of it the covalent union between the hapten and the skin transporter protein resulting on a complex formation that can activate the keratinocytes and those activate the dendritic cells, or just activate the last ones directly; in either case, the immune response will develop once the activation of T cells occur in the lymph nodes.

Normally the evaluation of the sensitizing potential of any compound was evaluated by *in vivo* procedures. Recently, with the prospect of minimizing animal experimentation and, taking advantage of this series of events typical of skin sensitizing reactions, a procedure is proposed to predict the sensitizing potential of antineoplastic agents, in this case Erlotinib and Imatinib, employing *in vitro* and *in chemico* technics previously approved for their use with cosmetics by the OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). Both antineoplastics will be analysed. Firstly using the DPRA technic (*Direct Peptide Reactivity Assay*), the ability of the compounds to be tested to form the hapten-protein activating complex pretends to be measured. With the aim to verify the keratinocytes activation an ARE-Nrf2 Luciferase test will be done through an *in vitro* culture of KeratinoSens™ cell line. And ultimately, by flow cytometry, employing an h-CLAT (*human- Cell Line Activation Test*), quantify the variation in the presence of certain membrane markers (CD86 and CD54) characteristic of dendritic cell activation.

Key words

Skin sensitization; antineoplastic; dendritic cells; monocytes; hapten; DPRA; KeratinoSens™; h-CLAT; Erlotinib; Imatinib

Student, TFG author: Anaïs Tomás Martínez

Academic tutor: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

External cotutors: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Paula Montero Magalló

Valencia, March 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, m'agradaria agrair la paciència i dedicació de totes les persones del laboratori del departament de Farmacologia dirigit pel Catedràtic Julio Cortijo a la facultat de Medicina de la Universitat de València. Ha sigut tot un plaer tindre l'oportunitat d'aprendre molt de totes elles, no sols coneixements aplicables al meu futur professional, sinó també per mostrar-me com funciona i es treballa realment a un laboratori d'investigació, especialment a qui ha sigut la meua tutora allí, moltes gràcies, Paula; i per suposat, a la meua tutora acadèmica, la professora i Doctora Patricia Almudéver per donar-me l'oportunitat d'estar allí.

En un pla més personal, moltes gràcies a les meues amigues i amics, pels ànims i confiança que he rebut de la vostra part cada vegada que jo els perdia al llarg de tots aquests anys d'estudi, haveu sigut una ajuda inestimable.

I finalment, moltes gràcies a la meua família, als meus pares i a la meua iaia, els quals no sols han tingut que conviure amb mi i aguantar-me dia rere dia, sinó que sense ells no hagués sigut possible que estudiés.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Mecanismos moleculares de la sensibilización cutánea..... | 1 |
| 1.2. Métodos de predicción de la sensibilización cutánea..... | 1 |
| 1.2.1. Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (<i>Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA</i>)..... | 2 |
| 1.2.2. Test de ARE-Nrf2 Luciferasa mediante KeratinoSens™..... | 3 |
| 1.2.3. Test de Activación de la Línea Celular (<i>human-Cell Line Activation Test, h-CLAT</i>)..... | 4 |
| 1.2.4. Relación cuantitativa ente estructura y actividad (<i>Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR</i>)..... | 4 |
| 1.3. Cáncer..... | 5 |
| 1.4. Terapias dirigidas..... | 6 |
| 1.4.1. Imatinib..... | 6 |
| 1.4.2. Erlotinib..... | 11 |
| 2. Objetivos..... | 14 |
| 3. Materiales y métodos..... | 14 |
| 3.1. Condiciones de cultivos celulares..... | 14 |
| 3.1.1. KeratinoSense™..... | 14 |
| 3.1.2. THP-1..... | 14 |
| 3.2. DPRA..... | 14 |
| 3.3. KeratinoSens™..... | 16 |
| 3.4. h-CLAT..... | 18 |
| 3.5. Criterios de aceptación del potencial sensibilizante..... | 20 |
| 3.6. QSAR..... | 21 |
| 4. Resultados..... | 21 |
| 4.1. Resultados del ensayo de DPRA..... | 21 |
| 4.2. Resultados del ensayo de KeratinoSens™..... | 22 |
| 4.3. Resultados de la técnica h-CLAT..... | 25 |
| 4.4. Resultados obtenidos mediante QSAR Toolbox..... | 26 |
| 5. Discusión..... | 27 |
| 6. Conclusión..... | 29 |
| 7. Bibliografía..... | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación de los cuatro eventos clave en un proceso de sensibilización cutánea y las técnicas <i>in quimico</i> , <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> aplicadas..... | 2 |
| Figura 2. Mecanismo de actuación de diferentes terapias dirigidas empleadas como tratamientos oncológicos..... | 5 |
| Figura 3. Mecanismo de acción de Imatinib frente a la proteína bcr-abl..... | 7 |
| Figura 4. Mecanismo de acción de Imatinib frente al receptor de membrana c-kit..... | 8 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de Imatinib frente al PDGFR..... | 9 |
| Figura 6. Efectos adversos posibles al ser tratado con Imatinib..... | 11 |
| Figura 7. Mecanismo de acción de Erlotinib frente a EGFR..... | 12 |
| Figura 8. Erupción acneiforme. Lesiones papulopustulares tras tratamiento con inhibidores de EGFR..... | 13 |
| Figura 9. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib por DPRA..... | 22 |
| Figura 10. Análisis del potencial sensibilizante de Imatinib mediante KeratinoSens™..... | 23 |
| Figura 11. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib mediante KeratinoSens™..... | 24 |
| Figura 12. Análisis del potencial sensibilizante de Imatinib realizado por h-CLAT..... | 25 |
| Figura 13. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib realizado por h-CLAT..... | 26 |
| Figura 14. Predicción negativa de QSAR Toolbox de la OECD sobre potencial sensibilizante de Imatinib..... | 27 |
| Figura 15. Predicción positiva de QSAR Toolbox de la OECD sobre potencial sensibilizante de Erlotinib..... | 27 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Modelo de predicción del potencial sensibilizante de un compuesto según los porcentajes de disminución peptídica..... | 15 |
| Tabla 2. Modelo de predicción de Cisteína..... | 16 |
| Tabla 3. Resumen de las predicciones obtenidas por las cuatro técnicas probadas..... | 28 |

ABREVIATURAS

ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia ; Leucemia Linfoblástica Aguda

AML: Acute Myeloid Leukemia ; Leucemia Mieloide Agua

AOP: Adverse Outcome Pathway ; Vía de Reacciones Adversas

ARE: Antioxidant Response Elements ; Elementos de Respuesta a Estrés Oxidativo

ATP: Adenosine triphosphate ; Adenosín trifosfato

CAS: *Chemical Abstract Services*

CV: Coeficiente de Variación

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: Deoxyribonucleic acid ; Ácido Desoxirribonucleico

DNCB: 2,4-Dinitroclorobenceno

DPBS: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay ; Ensayos Directo de Reactividad Peptídica

EC_{1.5}: Concentración a la cual la inducción de la actividad de la luciferasa es igual a 1,5

EC: *Effective concentration* ; concentración efectiva

EGF: Epidermal Growth Factor ; Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor ; Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ; Ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas

FBS: *Fetal Bovine Serum* ; Suero bovino fetal

FCS: *Fetal Calf Serum* ; Suero fetal de ternero

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor ; Tumor del Estroma Gastrointestinal

GPMT: *Guinea pig maximization test* ; Prueba de Maximización del Conejillo de Indias

h-CLAT: human-Cell Line Activation Test ; Test de Activación de Células Humanas

HPLC: High Performance Liquid Chromatography ; Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment ; Enfoques Integrados para Pruebas y Evaluación

IC₃₀: Concnetración mínima necesaria para provocar una disminución en la viabilidad celular del 30%

IC₅₀: Concnetración mínima necesaria para provocar una disminución en la viabilidad celular del 50%

IFN- γ : *Interferon gamma* ; Interferón gamma

IFR: Intensidad de fluorescencia relativa

IgG: Inmunoglobulina G

I_{max}: Inducción de la actividad luciferasa máxima global

Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1* ; Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch

LLNA: Local Lymph Node Assay ; Ensayo de Nódulos Linfáticos Locales

Log K_{ow}: Coeficiente de reparto octanol-agua

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases* ; Proteínas quinasas activadas por mitógenos

Medio RPMI-1640: *Medium Roswell Park Memorial Institute*

MFI: *Mean Fluorescence Intensity* ; Intensidad de Fluorescencia media

mRNA: messenger *Ribonucleic acid* ; Ácido ribonucleico mensajero

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio

NSCLC: Non-small Cell Lung Carcinoma ; Cáncer pulmoar no miocítico

Nrf2: *Nuclear erythroid 2-related factor 2* ; Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development ; Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico

PDGF: Platelet-derived Growth Factor ; Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PDGFR: Platelet-derived Growth Factor Receptor ; Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PI3K: *Phosphoinositol 3-kinase* ; Fosfoinositol 3-quinasas

QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship ; Relación Cuantitativa Estructura-Actividad

RFI: *Relative Fluorescence Intensity* ; Intensidad de Fluorescencia Relativa

SCF: Stem Cell Factor; Factor de Células Madre

SD: *Standard Deviation* ; Desviación estándar

SH: Src Homology ; Homología Scr

TGF: Transforming Growth Factor ; Factor de Crecimiento Transformante

THP-1: *human monocytes leukemia cell* ; Línea celular monocítica humana de leucemia

TK: Tyrosine-Kinase ; Tirofín-quinasas

TKI: Tyrosine-Kinase Inhibitor ; Inhibidor de Tirofín-quinasas

TNF- α : *Tumoral necrosis factor alpha* ; Factor de necrosis tumoral alfa

UN GHS: *United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* ; Sistema Global de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas

UV: *Ultra violet* ; Ultra violeta

VEGFR: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor ; Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

1. INTRODUCCIÓN

Según la *United Nation Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (UN GHS), se entiende que un compuesto químico es un sensibilizante cutáneo si es capaz de desencadenar una reacción alérgica cutánea al entrar en contacto con la piel. Se ha observado que no solo cosméticos o medicamentos de aplicación tópica producen este tipo de reacciones, sino que algunos fármacos de distribución sistémica también pueden llegar a producirlas. Dichas reacciones suelen caracterizarse por una serie de reacciones en cadena (AOP, *Adverse Outcome Pathway*). La primera de ellas es la unión covalente de un hapteno a una proteína transportadora de la piel dando como resultado un complejo que puede llegar a activar a los queratinocitos. Las células dendríticas, o bien, pueden ser activadas por los queratinocitos, o bien, directamente por el complejo hapteno-proteína, en cualquiera de los dos casos acaba desencadenándose una respuesta inmune al producirse la activación de los linfocitos T en los nódulos linfáticos (OECD 442C, 2015).

El fin de testar cualquier compuesto químico es identificar aquellos que en ocasiones pueden producir efectos secundarios, entre los que podemos encontrar reacciones de sensibilización cutánea. Que, al igual que otras reacciones de sensibilización, inmunológicamente hablando, se puede decir que es una de efecto retardado, iniciada por un químico de bajo peso molecular que denominaremos hapteno. Se suele desarrollar en dos etapas principales: la de inducción y la de provocación. En la primera, generalmente asintomática, se producirán linfocitos T específicos de alérgeno; y en la segunda, la de activación y respuesta, tiene lugar cuando un individuo previamente sensibilizado vuelve a tener contacto con el alérgeno (Pichler, 2019; OECD 442C, 2015).

1.1. Mecanismos moleculares de la sensibilización cutánea

De manera muy esquemática, la serie de reacciones que tienen lugar a partir del primer contacto, están caracterizadas por una secuencia de efectos adversos (*Adverse outcome pathway, AOP*) muy concretos descritos por la OECD en 4 eventos clave y representados en la Figura 1 a continuación (OECD 442C, 2015; Strickland et al., 2016).

El primer evento clave es la unión covalente del hapteno a proteínas transportadoras de la epidermis, concretamente a residuos de cisteína y/o lisina, este hecho hace que se activen los queratinocitos, segundo evento clave, produciendo una mezcla de citoquinas. A su vez, tanto el complejo hapteno-proteína como las citoquinas producidas por los queratinocitos, pueden producir el tercer evento clave, la activación de las células de Langerhans y dendríticas, que absorben y procesan el complejo hapteno-proteína, a la vez que maduran y empiezan a secretar moléculas proinflamatorias como la IL-8 y a expresar en su superficie los marcadores CD86 y CD54, receptores de quimiocinas. Estas células maduras migrarán a los nódulos linfáticos donde presentarán los antígenos a los linfocitos T, induciendo así la diferenciación y proliferación de los linfocitos T de memoria específicos de antígeno, cuarto evento clave de la sensibilización cutánea (Goebel et al., 2012; OECD 168, 2012).

1.2. Métodos de predicción de la sensibilización cutánea

Tradicionalmente el testado del potencial sensibilizante de cualquier compuesto químico solía estar basado en el cuarto evento clave del proceso de sensibilización cutánea mediante un ensayo de nódulos linfáticos locales (*Local Lymph Node Assay, LLNA*); un estudio *in vivo* cuyo principio radica en el aumento de la proliferación celular en los nódulos linfáticos próximos al punto de aplicación del posible alérgeno y que, por ende, este aumento es proporcional al potencial sensibilizante del alérgeno. Generalmente, requería de marcaje radiactivo (OECD 429, 2010), pero se han desarrollado técnicas alternativas que no lo requieren, como son, la bioluminiscencia como baremo de supervivencia celular, LLNA: DA (OECD 442A, 2010) las

técnicas ELISA o la citometría de flujo, con la que se mide el contenido de BrdU en el DNA de los linfocitos, LLNA: BdrU-ELISA o -FCM (OECD 442B, 2010). Antes, dicho procedimiento, era aplicado tanto en productos farmacéuticos como en cosméticos (Strickland et al., 2016) pero con el REGLAMENTO (CE) Nº12/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de noviembre de 2009, el testado de cosméticos en animales ha sido restringido, por lo que se han desarrollado técnicas alternativas basadas en el resto de eventos clave.

Por ello, precisamente basándose en el resto de eventos clave previamente descritos e ilustrados en la Figura 1 y empleando bases de datos comparativas se pueden llevar a cabo diferentes pruebas *in chemico*, *in vitro* e *in silico* con las que comprobar el potencial sensibilizante de los químicos en cuestión sin la utilización de animales, todas ellas presentes en los Enfoques Integrados para Pruebas y Evaluación (*Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA*).

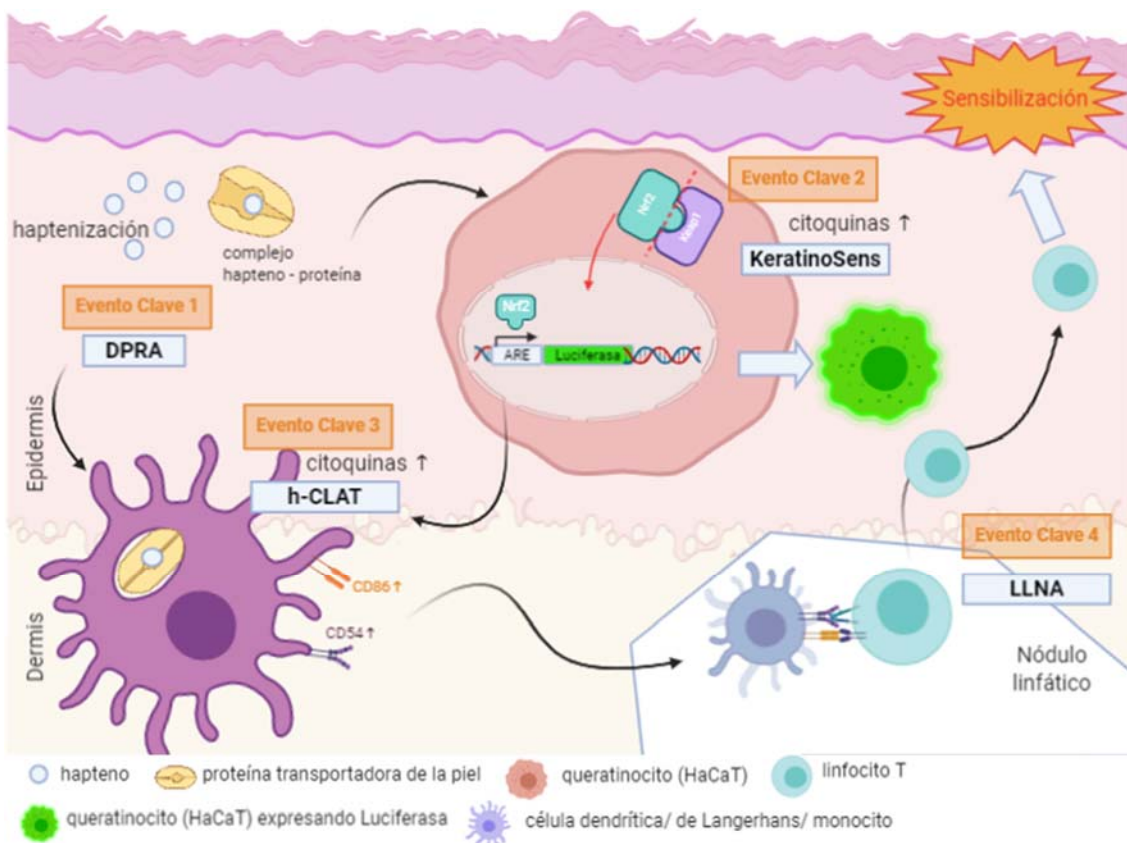


Figura 1. Representación de los cuatro eventos clave en un proceso de sensibilización cutánea y las técnicas *in químico*, *in vitro* e *in vivo* aplicadas. (Creada en BioRender.com)

1.2.1. Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (*Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA*)

Se trata de un procedimiento *in chemico* basado en el primer evento clave del proceso de sensibilización. Como se muestra en la Figura 1, este primer evento consiste en la formación de un complejo hapteno-proteína, es decir, el químico sensibilizante electrófilo, bien por su naturaleza o por la transformación que sufre en la piel, se une covalente e irreversiblemente a los residuos nucleofílicos de las proteínas transportadoras de la epidermis, siendo los principales los de lisina y cisteína (Schwöbel et al., 2011).

Basándose en estas premisas, mediante la técnica de DPRA se pretende cuantificar el potencial sensibilizante de un compuesto a partir de la medición de la cantidad de residuos de lisina y cisteína que quedan por unir del péptido sintético creado para tal fin al compuesto problema tras una incubación de 24 horas.

Para ello, se emplea un equipo de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) con el que se mide la concentración relativa de péptido, es decir, el que ha quedado libre en la reacción sin unir al químico a testar. Se calcula el porcentaje de disminución peptídica, e introduciéndolo en un modelo de predicción, se clasifican los químicos en cuatro niveles de reactividad que permiten discriminar entre productos sensibilizantes y no-sensibilizantes (OECD 442C, 2015) (Tabla 1, apartado de materiales y métodos).

El test de DPRA ha probado tener una reproducibilidad entre predicciones dentro del mismo laboratorio del 85%, su precisión de discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes es del 80% con una sensibilidad del mismo valor y una especificidad del 77% en comparación con los resultados obtenidos mediante LLNA. Pese a esto, para esta técnica es probable que se determinen como no sensibilizantes aquellos compuestos cuyo potencial sensibilizante esté en el rango entre bajo y moderado más que si muestran un potencial alto (Tabla 1). Además, no será posible detectar los compuestos que requieran un proceso de pro-haptenación, es decir, alguna modificación enzimática para que se unan a las proteínas transportadoras pero, en algunos casos, sí será posible detectar los pre-haptenos, los que han sufrido modificaciones abióticas antes de llegar a la epidermis. En contraposición se pueden encontrar los compuestos que no se unen covalentemente al péptido sintético, pero sí causan su oxidación, en este caso se puede considerar un porcentaje de disminución peptídica mayor del que realmente es, obteniéndose un falso positivo y/o la asignación de un potencial sensibilizante mayor del real (OECD 442C, 2015; Natsch et al., 2013).

1.2.2 Test de ARE-Nrf2 Luciferasa mediante KeratinoSens™

Se trata de un procedimiento *in vitro* que aprovecha el segundo evento clave del proceso de sensibilización, es decir, la entrada en contacto del alérgeno con los queratinocitos, siendo estos las primeras células con las que interactúan en una reacción de sensibilización.

Cuando esto ocurre, estos haptenos sensibilizantes pueden inducir cambios en los residuos de cisteína de la proteína sensor Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) localizada en el citoplasma provocando su disociación del factor de transcripción Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) al que estaba unida. Ahora el Nrf2 libre es capaz de entrar en el núcleo donde puede unirse y activar la transcripción de los genes dependientes de Elementos de Respuesta a Estrés Oxidativo (*Antioxidant Response Elements*, ARE).

En el test, se emplea la línea celular inmortalizada KeratinoSens™ transfectada con el gen de la luciferasa aguas abajo de un promotor constitutivo unido a un elemento ARE, de manera que, al producirse una reacción de sensibilización cutánea, Nrf2 se unirá a los genes ARE y estos al expresarse, a su vez producirán la expresión del gen de la luciferasa haciendo posible la detección mediante la luminiscencia producida (OECD 442D, 2015; Strickland et al., 2016).

El test mediante KeratinoSens™ ha probado tener una reproducibilidad tanto entre experimentos del mismo laboratorio como entre diferentes laboratorios una reproducibilidad del 85% y, comparando con los datos obtenidos de compuestos químicos mediante LLNA, su precisión es del 77%, su sensibilidad del 78% y su especificidad del 76% a la hora de discriminar entre compuestos sensibilizante y no sensibilizantes. Al igual que para la técnica de DPRA, esta técnica puede que determine como no sensibilizante a aquellos compuestos que tengan un potencial de sensibilización entre bajo y moderado. A su vez también hay que desconfiar de una predicción negativa realizada a sustancias exclusivamente reactivas a los residuos de lisina, que por su mecanismo de acción no provoquen un estrés oxidativo, a las que resultan ser pro y pre-haptenos por la limitada capacidad metabólica de las células empleadas (Fabian et al., 2013) y las condiciones experimentales y por supuesto las sustancias citotóxicas o las que interfieran en la actividad de la luciferasa, que pueden llegar a enmascarar un resultado positivo o exacerbarlo (OECD 442D).

1.2.3. Test de Activación de la Línea Celular (*human-Cell Line Activation Test*, h-CLAT)

En este caso también se trata de un procedimiento *in vitro*, esta vez basado en el tercer evento clave del proceso de sensibilización, la activación de las células dendríticas tras la asimilación del complejo hapteno-proteína o bien como consecuencia de la activación de los queratinocitos, como se ilustra en la Figura 1 (OECD 442E, 2015).

Se considera que estas células presentadoras de antígenos están maduras o activas cuando, al entrar en contacto con el sensibilizante, sufren cambios fenotípicos importantes, entre ellos la expresión de diferentes marcadores de superficie como CD54 (una molécula de adhesión intercelular) y CD86 (una molécula coestimuladora) entre otras (Sakaguchi et al., 2007).

De manera que, mediante la línea celular THP-1 (*human monocytes leukemia cell*), capaz de sufrir los mismos cambios que sufre una célula dendrítica o de Langerhans en este tipo de procesos (Ashikaga et al., 2006), tras 24 horas en incubación junto al químico problema, empleando citometría de flujo, se pretende medir la expresión de estos marcadores de superficie en las células a partir de la fluorescencia emitida por antígenos específicos de CD86 y CD54 marcados previamente con fluorocromos distintos (OECD 442E, 2015).

El método de h-CLAT ha mostrado poseer una reproducibilidad del 80% tanto dentro del mismo laboratorio como entre laboratorios y, en comparación con los resultados obtenidos en experimentos con LLNA, su precisión para distinguir entre compuestos sensibilizantes y no sensibilizantes es del 85%, su sensibilidad, del 93% y su especificidad, del 66%. Al igual que las otras dos técnicas previamente mencionadas, se pueden obtener falsos negativos de aquellos compuestos que tengan un potencial sensibilizante entre bajo y moderado con muchísima más frecuencia que si mostrase un potencial alto, así como para aquellos compuestos con un coeficiente de reparto octano-agua ($\text{Log } K_{ow}$) superior a 3,5 (Takenouchi et al., 2013); y, como en el caso de KeratinoSense™, debido tanto por las condiciones experimentales como por la limitada capacidad metabólica de la línea celular empleada (Fabian et al., 2013), los compuestos citotóxicos y los pro y pre-haptenos, sobre todo aquellos con un ratio de oxidación lento y que necesitan de activación enzimática, por ejemplo de las de la vía del citocromo P450, también pueden dar resultados negativos (OECD 442E, 2015).

En cualquier caso, excepto para clasificar un químico en la categoría 1 del Sistema Global de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (UN GHS), no se podrá tomar un resultado positivo por sí mismo como indicador del potencial sensibilizante del químico, sino que, por lo establecido en los IATA, será necesario que dos de las tres pruebas den positivo para ello (“GHS (Rev.8) (2019) - Transport - UNECE”).

1.2.4. Relación cuantitativa ente estructura y actividad (*Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR)

Con el fin de predecir el potencial sensibilizante de posibles alérgenos, sin necesidad de llegar a la experimentación, se combinan técnicas virtuales de diseño y visualización, de estimación de propiedades fisicoquímicas moleculares, sobretodo de los grupos funcionales, en contraste con bases de datos, estadística y bioinformática. Para llevar a cabo este tipo de estudios se necesita conocer la estructura molecular de diferentes compuestos con una misma farmacodinámica, es decir, de posibles ligandos para una misma diana, sus propiedades fisicoquímicas calculadas *in silico* y datos de actividad biológica de cada uno de los compuestos estudiados (Strickland et al., 2016; Lozano-Aponte and Scior, 2012; The OECD QSAR Toolbox - OECD, 2020).

1.3. Cáncer

Normalmente, que un individuo padezca cáncer implica la alteración de genes esenciales para la supervivencia de la célula, que originalmente son imprescindibles para el desarrollo embrionario, como *Rb* o *Ras*, regulador del ciclo celular y supresor de tumores y componente central de las vías de señalización celular, respectivamente.

La mutación en un único gen no implica necesariamente que se vaya a sufrir un cáncer, pero sí aumenta la probabilidad. Los genes decisivos para ello suelen ser los genes supresores de tumores, sin los cuales no se supera la fase embrionaria, y los encargados de la interacción entre células, los que deciden si se debe impulsar a la célula a dividirse, diferenciarse o morir, la lista de estos incluye ejemplos de prácticamente cualquier tipo de molécula involucrada en la señalización celular, receptores transmembrana y sus ligandos, proteínas de unión a guanosin-trifosfato, quinasas etc. (Alberts et al., 2002).

Una de las principales mutaciones sufridas y de las más importantes es en el gen *p53* puesto que supone un triple punto de control, del ciclo celular, de la apoptosis y de la estabilidad génica; otras veces, como en el caso de la activación de tirosin-quinazas, como por ejemplo el receptor de EGF (*Epidermal Growth Factor*) o de la proteína de la familia *Ras*, las mutaciones son responsables de alterar las vías de señalización, autorizando la proliferación celular cuando no es necesaria (Alberts et al., 2002).

Generalmente los tratamientos más extendidos contra el cáncer, más allá de la cirugía como último recurso, suelen ser la radioterapia y la quimioterapia que destruyen las células, independientemente de si estas son sanas o tumorales. Actualmente, en algunos casos en los que las mutaciones causantes del cáncer están bien identificadas, se suele abogar por las terapias dirigidas, con las que solamente se pretende atacar a las células mutadas al actuar específicamente sobre las dianas moleculares alteradas (Figura 2), bloqueando las señales de activación de receptores esenciales para la división y expansión celular, impidiendo así que se reproduzcan las células cancerosas de manera descontrolada (Riley and Desai, 2009; "Terapias dirigidas contra el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer," 2020).

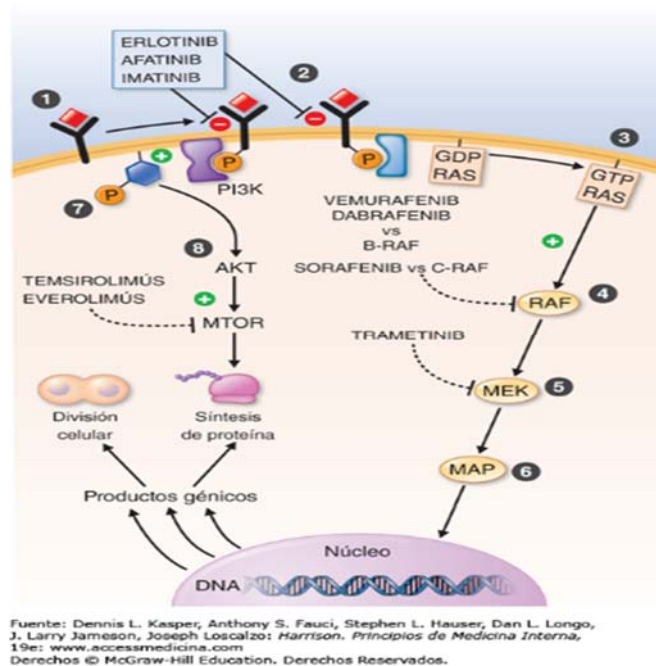


Figura 2. Mecanismo de actuación de diferentes terapias dirigidas empleadas como tratamientos oncológicos ("Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical").

1.4. Terapias dirigidas

Por el método de actuación de estas terapias dirigidas (Figura 2) sería de esperar que mostrasen una menor toxicidad hacia las células sanas que los tratamientos más convencionales, sin embargo, dado que afectan a dianas que también están activas en las células no mutadas, aunque sea en menor medida, pueden llegar a manifestarse algunos efectos secundarios importantes. Uno de los efectos adversos más frecuentes son las reacciones de sensibilización cutánea como las previamente descritas, que normalmente suele estar desencadenadas por la entrada en contacto directo del compuesto con la piel pero, en ocasiones también se desarrollan por la distribución sistémica del químico (Pichler, 2019), pudiendo llegar a ser muy severas en algunos casos. Un ejemplo de ello son aquellos casos en los que el fármaco es un inhibidor de la Tirosin-Quinasa (*Tyrosine-Kinase Inhibitor*, TKI) por las funciones tan amplias a nivel celular que tienen. En este grupo se encuentran Imatinib y Erlotinib, dos ejemplos de este tipo de terapias, en las que este trabajo va a estar centrado, y con los cuales muchos de los pacientes suelen experimentar una reacción de este tipo de mayor o menor severidad (Eaby-Sandy and Lynch, 2014; Macdonald et al., 2015; Reyes-Habito and Roh, 2014).

1.4.1. Imatinib

Imatinib es un fármaco derivado de la molécula 2-fenilaminopirimidina que es comercializado como su sal, melisato de imatinib bajo el nombre de *Glivec*[®] o *Imatinib Normon*[®] (Europa/Australia) (“FICHA TECNICA IMATINIB SANDOZ 400 MG COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG”), de los primeros en ser sintetizados como inhibidor competitivo del ATP que iniciaría la fosforilación de las tirosinas, y por tanto, la activación de la Tirosin-Quinasa (*Tyrosine-Kinase*, TK). Está diseñado para sentir predilección por el dominio TK de ciertas proteínas, siendo las más importantes, sobre todo por las enfermedades que provocan: *bcr-abl1*, *c-kit* y PDGFR.

- Proto-oncogen *bcr-abl1* es una proteína aberrante producida por el cromosoma Filadelfia (Ph), es decir, el cromosoma 22 tras sufrir una translocación recíproca con el 9. Al poseer este genotipo, como se puede observar en la Figura 3A, tras la unión del ATP al dominio TK de la proteína, esta se queda en perpetuo funcionamiento, promoviendo la fosforilación de las tirosinas del sustrato, activándolo y desencadenando una cascada de transducción que promueve la mieloproliferación, por lo que es altamente probable desarrollar diversos tipos de leucemia, siendo entre otras en las que más se emplea Imatinib como tratamiento de primera línea, la leucemia mieloide aguda (*Acute Myeloid Leukemia*, AML) y la leucemia linfoblástica aguda (*Acute Lymphoblastic Leukemia*, ALL). (Kang et al., 2016; Macdonald et al., 2015). En este caso, entre los diferentes dominios de esta proteína está el de homología src (SH) a cuyo dominio de quinasa SH1 se unirá Imatinib (Kang et al., 2016) impidiendo así la activación del sustrato y la consecuente cascada de señalización (Figura 3B).

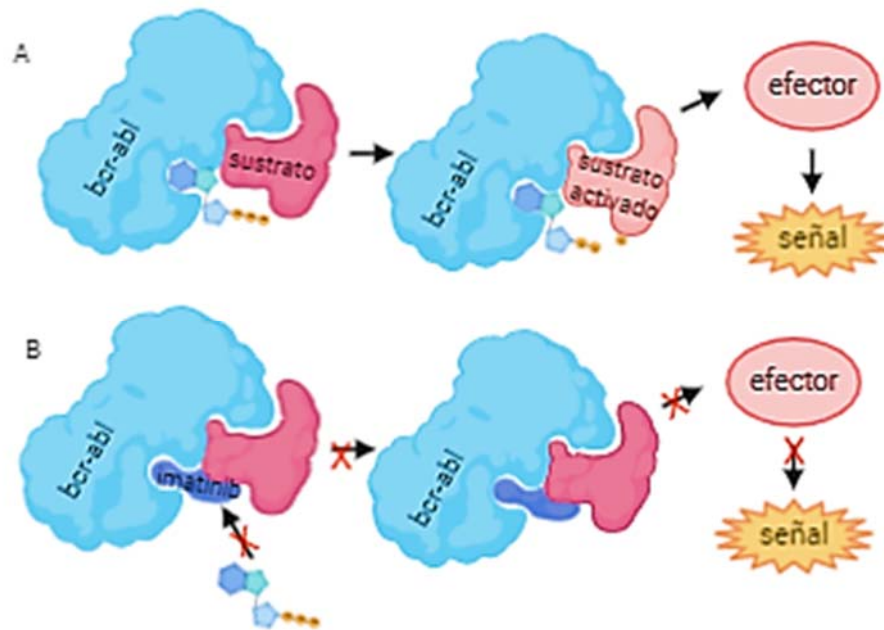


Figura 3. Mecanismo de acción de Imatinib frente a la proteína bcr-abl. A- Activación constitutiva de la proteína mutada *bcr-abl*. B- Inhibición de la activación constitutiva tras la unión de Imatinib al sitio de unión TK de la proteína aberrante *bcr-abl*. (Creadas en BioRender.com).

- c-kit* (CD117), un protooncogen localizado en el cromosoma 4 y principalmente considerado como un receptor del factor de células madre (*Stem cell factor*, SCF) resulta vital en procesos tales como la gametogénesis, el mantenimiento de la melanogénesis y hematopoyesis, y normalmente suele estar presente en el endotelio vascular, epitelio mamario, glándulas sudoríparas y astrocitos de la retina, además de influenciar la normal actividad del sistema nervioso y gastrointestinal al relacionarlo con las células intersticiales de Cajal. Es decir, que si está constitutivamente activado por una mutación, independientemente de que se produzca la unión con su sustrato o no, este receptor se fosforilará continuamente sin regulación haciendo que las cascadas de transducción PI3K y MAPK estén constitutivamente activas, promoviendo la diferenciación y proliferación de células estromales (Figura 4A) por lo que, dadas sus funciones, la sobreexpresión o la acumulación de mutaciones en esta proteína suele estar relacionada con diversos tipos de cáncer como diferentes tipos de leucemia como *bcr-abl1*, disgerminoma ovárico unilateral y melanomas entre otros, pero sobretodo, y para el que se recomienda el uso de Imatinib, es para el tumor del estroma gastrointestinal (*Gastrointestinal stromal tumor*, *GIST*) metastásico y no reseca y para la mastocitosis sistémica (Abbaspour Babaei et al., 2016; "Imatinib Mesylate - National Cancer Institute," 2006). En este caso, al igual que para el resto de dianas aquí señaladas, Imatinib impide la fosforilación por parte del ATP del dominio TK de c-Kit impidiendo en consecuencia que se activen las cascadas de señalización y provocando la apoptosis de las células mutadas (Figura 4B).

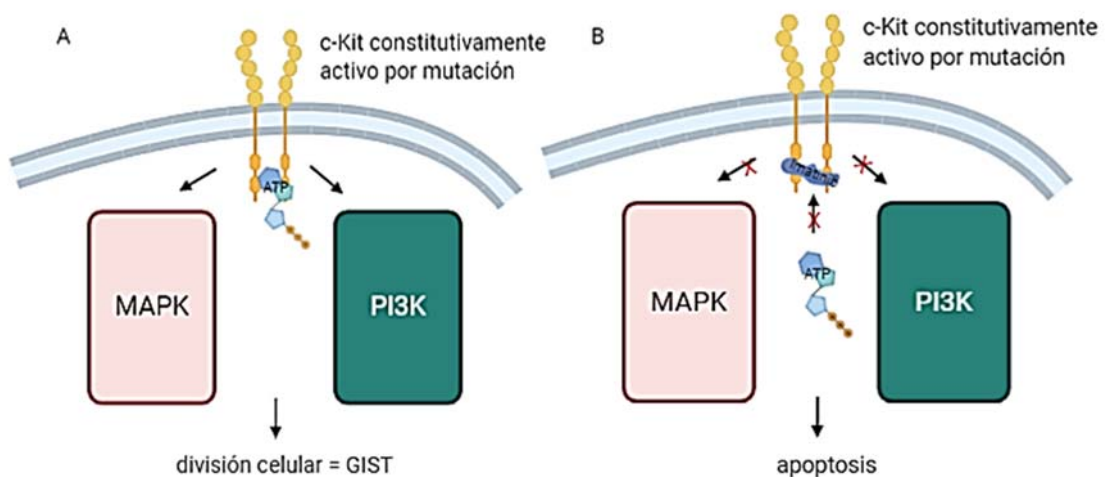


Figura 4. Mecanismo de acción de Imatinib frente al receptor de membrana c-kit. A- Receptor de membrana c-Kit constitutivamente activado. B- Inhibición de la división celular tras la unión de imatinib. (Creada con BioRender.com)

- PDGFR (*Platelet-derived growth factor receptor*) es el receptor del ligando del factor de crecimiento derivado de plaquetas cuya función principal es la de estimular la división celular de células provenientes del neuroectodermo y del tejido mesenquimal, por lo que está presente en tejidos conectivos y órganos del sistema linfático, circulatorio y musculoesquelético (Chang et al., 2018), es decir, que tiene propiedades quimioatrayentes y está relacionado con la osteo y eritrogénesis, así como en la cicatrización. De manera que, las células mutadas producen de manera constitutiva el sustrato (PDGF) que hace que se active la división, proliferación, reclutamiento celular etc. al fosforilarse el dominio TK del receptor y desencadenar las cascadas de transducción MAPK y PI3K (Figura 5A).

Sin embargo, la función de mayor interés en los procesos tumorigénicos y por la que resulta interesante como diana es la de la regulación de la angiogénesis, puesto que tiene la capacidad de regular el reclutamiento y proliferación de células perivasculares mientras hace que aumente la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular endothelial growth factor, VEGF*), siendo este el encargado del control de la proliferación del tejido endotelial tanto sano como tumoral. Además, PDGF también controla la presión intersticial del tumor y la estimulación autocrina de sus células (Raica and Cimpean, 2010). Por todo ello al par PDGF/PDGFR se lo ha relacionado con diferentes tipos de sarcomas (Chang et al., 2018) y melanomas, así como con el síndrome hipereosinofílico y la leucemia mielomonocítica, un tipo de AML poco frecuente, (Macdonald et al., 2015) y a la vez en tumores pulmonares, mamarios, ováricos y prostáticos con tendencia metastásica. (Raica and Cimpean, 2010). De manera que, Imatinib, al igual que hacía para *c-kit*, bloquea la activación de las cascadas de señalización promovidas por el par PDGF/PDGFR tras su unión al dominio TK de PDGFR (Figura 5B).

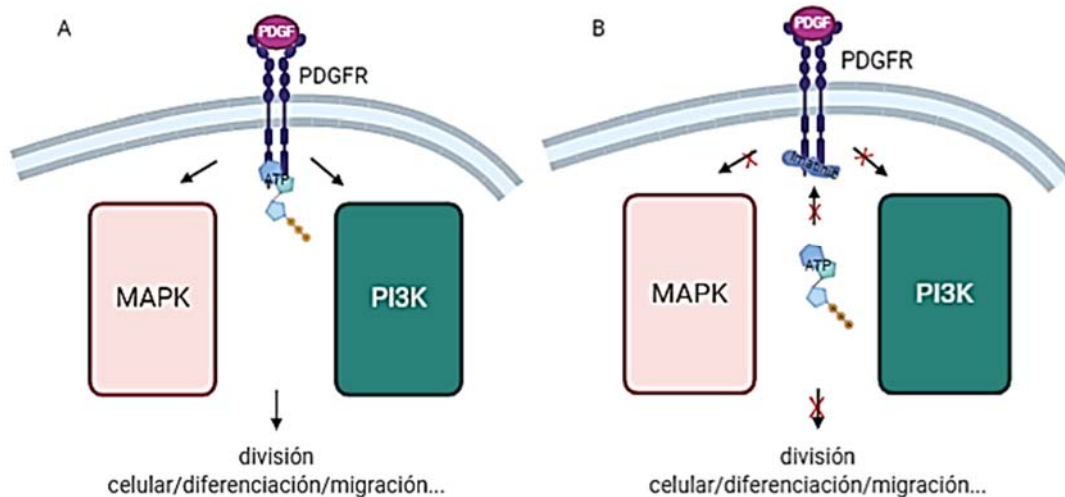


Figura 5. Mecanismo de acción de Imatinib frente al PDGFR. A- PDGFR constitutivamente activado por regulación autocrina de células mutadas. B- Inhibición por Imatinib de las funciones normales del par PDGF/PDGFR tras unirse al dominio TK y bloquear las cascadas de señalización. (Creada con BioRender.com)

Efectos adversos cutáneos

Pese a que en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones (Abouantoun and MacDonald, 2009; Kilic et al., 2000; Liu et al., 2014; Ohishi et al., 2013; Wang et al., 2017) se ha demostrado sobradamente el efecto beneficiosos de Imatinib, no solo para las enfermedades arriba descritas, sino que además, el efecto de la dosis sobre el crecimiento celular (Chu et al., 2004; Cross and Lyseng-Williamson, 2007). Sin embargo, como previamente se ha mencionado, también tiene diversos efectos adversos, aunque no han sido descritos en estos estudios, solamente en los realizados con humanos.

Las reacciones cutáneas similares a las que se dan en las reacciones de sensibilización cutáneas son uno de los efectos secundario no hematológicos más habituales (entre un 7% y 88,9% de los pacientes), su aparición y gravedad suelen estar directamente relacionadas con la dosis (Jha et al., 2013) si a ello le sumamos el bajo peso molecular del fármaco, según lo establecido por Amitay-Laish et al., 2011, se infiere que estos efectos adversos no son inmunogénicos, sino que son debido al propio efecto del fármaco, es decir, que están relacionados con las funciones normales de sus dianas y su inhibición, que impide que se lleven a cabo. Siendo algunos de los más habituales, de menor a mayor gravedad:

El edema periorbital (Figura 6A y B) y en extremidades así como el aumento de peso por la retención de líquidos normalmente tratados con una reducción de la sal presente en la dieta y diuréticos, está ocasionado por la desregulación de la modulación del flujo del fluido intersticial debida a la inhibición de PDGFR, que está, a su vez, también relacionada con la aparición ocasional de una erupción morbiliforme dependiente de dosis en tronco y antebrazos, y en la cara en casos muy severos que suele ser tratada con esteroides tópicos u orales y antihistamínicos o dependiendo del grado, con la directa suspensión del tratamiento (Figura 6D y E) (Reyes-Habito and Roh, 2014; Macdonald et al., 2015; Amitay-Laish et al., 2011).

Por otra parte, la inhibición de *c-kit* provoca cambios en la pigmentación, normalmente hipopigmentación difusa y despigmentación relacionados con que el SCF induzca la melanogénesis y guíe a los melanocitos hacia la dermis en este caso la solución a este problema radica en la disminución de la dosis o total suspensión del tratamiento (Abbaspour Babaei et al., 2016; Reyes-Habito and Roh, 2014; Amitay-Laish et al., 2011). A su vez también pueden darse casos de hiperpigmentación en parches (Figura 6F), aunque con mucha menos frecuencia, atribuida a la presencia de melanófagos dérmicos (Arora et al., 2004).

Además, en algunos pacientes, ya con menor frecuencia, aparecieron erupciones psoriasiformes en cuero cabelludo, brazos y tronco (Figura 6C). En este caso a Imatinib, además de la supresión de c-kit y PDGFR, también se le atribuye un papel modulador sobre los linfocitos T que, junto con PDGF y SCF tienen un papel muy importante en el desarrollo de la psoriasis. Se ha propuesto que el fármaco interfiere en la producción de citosinas y en la proliferación de las células T, además de inhibir la secreción de interferón- γ (INF- γ) por parte de los linfocitos T efectores, es decir, que provoca una desregulación del sistema inmune. (Amitay-Laish et al., 2011).

Otro efecto registrado con una incidencia bastante baja en pacientes de AML es la inducción del Síndrome Stevens-Johnson (Figura 6G y H), un tipo de exantema grave con componentes descamativos potencialmente mortal, que suele estar relacionado con reacciones inmunológicas a diferentes fármacos, normalmente antiinflamatorios no esteroideos y en algún caso aislado, con bacterias. No se conoce mucho porqué se da esta enfermedad, solamente que podría estar relacionada con la proliferación de linfocitos T. El tratamiento inmediato radica en la supresión del fármaco, dado que ha demostrado tener un componente dependiente de la dosis (Petzer et al., 2010); y la administración de corticosteroides sistémicos, inmunoglobulinas intravenosas, ciclosporina y antagonistas del factor de necrosis tumoral alfa (*Tumoral necrosis factor alpha, TNF α*) (Amitay-Laish et al., 2011; Hasegawa and Abe, 2020; Jha et al., 2013; Shanbhag et al., 2020). En este caso se requiere más investigación.

En enfermedades inflamatorias crónicas de la piel provocadas por linfocitos T como la psoriasis, la dermatitis atópica y la dermatitis alérgica de contacto, según Mascia et al., 2003 todos estos efectos secundarios, podrían explicarse porque los linfocitos Th1 activados son la principal fuente de TNF- α e INF- γ y estas citocinas a su vez, suelen iniciar una sobreexpresión de mediadores inflamatorios en los queratinocitos (CCL2, CCL5, CXCL8 y CXCL10), y como se ha comentado previamente, la desregulación de estos procesos y sus consecuencias serían esperables dado que Imatinib interfiere en todas estas reacciones.



Figura 6. Efectos adversos posibles al ser tratado con Imatinib. A- Edema periorbital tras tratamiento con Mesilato de Imatinib. Pre-operación B- Post-operación (McClelland et al., 2010). C- Placa psoriasiforme. D- Erupción exantemática en tronco. E- Dermatitis exfoliativa, ligada a fiebre, dependiente de dosis y consistente en maculopápulas eritematosas y purpúricas asociadas a pústulas no foliculares (Valeyrie et al., 2003). F- Hiperpigmentación (Amitay-Laish et al., 2011) G- Erosiones graves de la mucosa oral que se manifiestan varios días después del desarrollo de las lesiones cutáneas, parte de la sintomatología del Síndrome Stevens-Johnson. H- Lesiones cutáneas generalizadas en pecho y abdomen después de una semana de tratamiento con Imatinib caracterizadas por una erupción eritematosa morbiliforme pruriginosa, parte de la sintomatología del Síndrome Stevens-Johnson (Hsiao et al., 2002).

1.4.2. Erlotinib

Erlotinib es un compuesto derivado de la quinazolina, normalmente comercializado bajo el nombre de Tarceva® catalogado como inhibidor del receptor del factor de crecimiento epitelial (*Epithelial growth factor receptor, EGFR, ErbB1 o HER1* en humanos) ("Tarceva, European Medicines Agency," 2018) y como su propio nombre indica, este receptor se encarga del mantenimiento del epitelio (Aw et al., 2018), es decir, que suele estar altamente expresado en células endoteliales, queratinocitos indiferenciados y con capacidad proliferativa de las capas basales y suprabasales de la epidermis, sebocitos y la vaina radicular externa del pelo (Liu et al., 2013; Reyes-Habito and Roh, 2014).

Normalmente EGFR suele estar inactivo hasta que sus ligandos principales EGF y el factor transformante de crecimiento (*Transforming growth factor, TGF α*) se le unen, pasa a estar en forma homodimérica, autofosforila su extremo C-terminal provocando la señalización y activación de una cascada de proteínas que se asociarán con las fosfotirosinas al unirse a sus dominios SH₂. Este hecho propiciará el inicio de cascadas de transducción de diversas señales,

que conducen a la síntesis de DNA y a la proliferación celular y que, a su vez, serán responsables de modular respuestas como la migración y adhesión celular; por lo tanto, cualquier sobreexpresión o mutación de este receptor puede conllevar a la activación constitutiva de muchos factores diferentes implicados en la proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Figura 7A) (Riley and Desai, 2009). De manera que, Erlotinib, compitiendo con el ATP, se une de manera reversible al dominio catalítico intracelular de la TK del EGFR, impidiendo así la fosforilación de este, bloqueando la cadena de transducción de señal y con ello, los efectos tumorigénicos asociados con la activación de EGFR (Figura 7B) (“Tarceva, European Medicines Agency,” 2018).

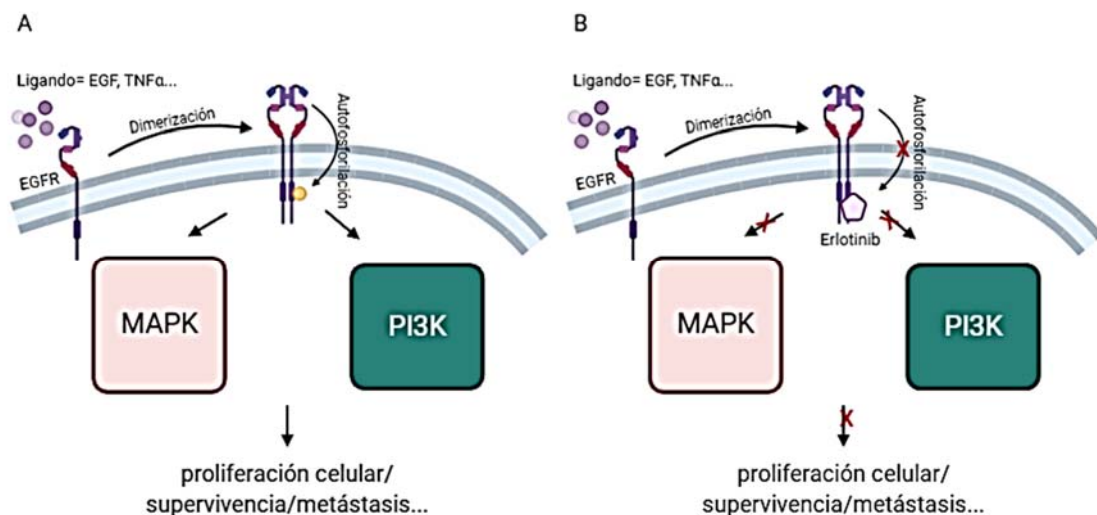


Figura 7. Mecanismo de acción de Erlotinib frente a EGFR. A- Mecanismo de activación normal de EGFR. B- Inhibición de la división celular tras la unión de Erlotinib. (Creada con BioRender.com)

Las mutaciones más comunes sufridas en el gen de este receptor son una delección del exón 19 en las que se elimina un motivo del dominio TK de Leucina-Arginina-Glutamato-Alanina y una sustitución en el exón 21 de una Arginina por una Leucina en el codón 858 (Rosell et al., 2006; Togashi et al., 2014). Dichas mutaciones suelen emplearse como marcadores moleculares en diferentes tipos de cáncer en los que se recomienda el uso de Erlotinib en caso de ser las células positivas para ellas, puesto que si no lo son, el tratamiento no surtirá efecto debido al mecanismo de acción seguido por este antineoplásico (“Tarceva, European Medicines Agency,” 2018); este es el caso de los cánceres de pulmón de células no microcíticas (*Non-small cell lung cancer, NSCLC*) (Gallagher-Colombo et al., 2015) metastásicos no resecables, entre los que se incluyen el carcinoma de células escamosas, el de células grandes y el adenocarcinoma (Pazhouhandeh et al., 2017), en ellos se emplea como tratamiento principal, y como secundario junto a Gemcitabina para el cáncer pancreático metastásico (“Tarceva, European Medicines Agency,” 2018).

Efectos adversos cutáneos

Al contrario que en el caso de Imatinib, la administración de Erlotinib suele relacionarse con reacciones adversas más graves y con una incidencia bastante alta (entre un 50 y 90% de los pacientes (Macdonald et al., 2015)) pero también dependientes de dosis, siendo, de menor a mayor gravedad, la sequedad y picor, alteraciones capilares, paroniquia en uñas y dedos y la más frecuente, la aparición de una erupción papulopustular acneiforme (Figura 8) en cuero cabelludo, cara, pecho y espalda (Reyes-Habito and Roh, 2014). Todas estas reacciones no resultan extrañas si se tiene en cuenta en qué células está presente y su función para con la regeneración y mantenimiento epidérmico. Suelen tratarse con corticosteroides, antiinflamatorios, antibióticos con el fin de evitar infecciones bacterianas secundarias y en

algunos casos, por las molestias y la severidad de las erupciones, se llega a suspender el tratamiento (Aw et al., 2018; Shi et al., 2016).



Figura 8. Erupción acneiforme. Lesiones papulopustulares tras tratamiento con inhibidores de EGFR (Grado 1) en A- pecho, B- cuero cabelludo y C- cara; (Grado 2) en D- brazos y E-F- piernas (Reyes-Habito and Roh, 2014); G- Reacción severa (Grado 3) en cara tras un tratamiento con Erlotinib (Eaby-Sandy and Lynch, 2014).

En un estudio cuyo objetivo era definir los cambios cutáneos y sistémicos causados por terapias con esta diana realizado en ratones a los que se les había eliminado el EGFR de la epidermis, se observaron a partir del sexto día de vida de estos, los mismos síntomas que se aprecian en pacientes tras recibir este tratamiento (Figura 8)(Mascia et al., 2013). Según este mismo estudio “Antes del desarrollo de lesiones se detectó un aumento de la expresión de ARNm de quimiocinas asociado con la infiltración temprana de macrófagos y mastocitos y la infiltración posterior de eosinófilos, linfocitos T y neutrófilos”. Por ello, según estos resultados, podrían emplearse estas células como posibles biomarcadores a una reacción temprana de un fármaco anti-EGFR.

El caso es que los resultados obtenidos en el estudio en ratones de Mascia et al., 2013 demostraron que al inhibir EGFR, se produce un daño en el tejido provocando que las células basales empiecen a liberar CXCL y CCL, quimioatrayentes que reclutan leucocitos y neutrófilos que liberan más citosinas efectoras que contribuirán a aumentar la inflamación tisular, como la IL-8 (Eaby-Sandy and Lynch, 2014). Además, a este receptor también se le atribuye la capacidad de frenar las reacciones inflamatorias dependientes de IL-1 a nivel folicular, molécula liberada por macrófagos, monocitos y células dendríticas como respuesta al $TNF\alpha$, por lo que se promueve favorablemente la inflamación tisular y la aparición de las erupciones cutáneas etc. al inhabilitar las señales de control (Macdonald et al., 2015).

A su vez en la mayoría de casos, la erupción cutánea suele emplearse como marcador clínico de la eficiencia terapéutica del tratamiento, al ser una señal clara de la inhibición de EGFR no solo en las células sanas, sino también, en consecuencia, sobre las células tumorales en pacientes con NSCLC (Liu et al., 2013) al mismo tiempo, diferentes estudios de eficiencia realizados sobre pacientes con este tipo de cáncer han denotado una diferencia poblacional entre los que eran o habían sido fumadores y no fumadores, siendo los primeros menos propensos a mostrar síntomas cutáneos adversos y en consecuencia, el fármaco tiene una menor eficacia en ellos por

tener una menor biodisponibilidad en plasma (Steffens et al., 2016; “Tarceva, European Medicines Agency,” 2018).

2. OBJETIVOS

Comprobar la validez de las técnicas citadas, DPRA, KeratinoSens, h-CLAT y QSAR para predecir el potencial sensibilizante de los medicamentos antineoplásicos Erlotinib e Imatinib mediante las técnicas y los criterios establecidos por la OECD para tal fin.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se detalla el procedimiento establecido para cada una de las técnicas a evaluar con las que se pretende establecer el potencial sensibilizante de los antineoplásicos Imatinib (STI571 Selleckchem) y Erlotinib (S7786 Selleckchem).

3.1. Condiciones de cultivos celulares

Previa a la realización de las diferentes técnicas *in vitro*, es necesario el cultivo rutinario de las diferentes líneas celulares que van a ser empleadas.

3.1.1. KeratinoSens™

Para llevar a cabo el cultivo de la línea celular transfectada KeratinoSens™ (Givaudan Schweiz AG) empleada en el test de ARE-Nrf2 Luciferasa, las células se incubaron hasta alcanzar la confluencia deseada en frascos de 75cm², en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), low glucose, Glutamax™ Supplement, pyruvate (Gibco, 11570586) al 9,1% de FCS (*Fetal Calf Serum*) (Amimed, 2-01F00-I) con 5,5mL de Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/mL) (Gibco, 11558616).

3.1.2. THP-1

En lo referente al cultivo de las células THP-1 (*human monocytes leukemia cell*) (LGC Standards, ATCC-TIB-202) empleadas en la técnica de h-CLAT, también se incubaron hasta alcanzar la confluencia deseada, en este caso empleando frascos de 175cm², medio RPMI-1640 (*Medio Roswell Park Memorial Institute*) (ATCC, 30-2001) suplementado con un 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GE Healthcare Life Sciences, SV30160.03), 100 unidades/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina (Lonza, DE 17-602E).

3.2. DPRA

Con el fin de realizar la determinación de sensibilización mediante la técnica de DPRA es necesario preparar dos soluciones estándar con los péptidos sintéticos de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) (Genosphere Biotechnologies) y de lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) (Genosphere Biotechnologies) explícitamente cada vez que vaya a realizarse un experimento; la primera en tampón fosfato pH 7,5 y la segunda en tampón de acetato de amonio pH 10,2, ambas a una concentración final de 0,667mM.

A partir de estas soluciones estándar, se procedió a preparar una curva de calibrado del péptido, los controles establecidos por la OECD y las mezclas con los antineoplásicos anteriormente mencionados, Erlotinib e Imatinib, a diferentes concentraciones; y todas ellas se incubaron en viales de cristal adecuados para su futuro análisis mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), en oscuridad a 25±2,5°C durante 24±2horas.

Las disoluciones con los antineoplásicos a testar, técnicamente y siguiendo las directrices establecidas por la OECD, debían ser incubadas con la solución estándar con los péptidos sintéticos a una relación 1:10 para la cisteína (0,5mM de péptido y 5mM compuesto a testar) y

1: 50 respecto a la lisina (0,5mM de péptido y 25mM compuesto a testar). Sin embargo, llegar a dichas concentraciones con los antineoplásicos resulta inviable puesto que precipitan al instante dificultando el saber cuánto químico queda realmente disuelto en la solución y pudiendo ocasionar daños en el equipo de medición al poder obstruir la columna con el precipitado, por ejemplo. Por ello, al final se llevaron a cabo disoluciones a 5mM y puesto que seguía produciéndose precipitación, se adaptaron las concentraciones de las disoluciones a testar (2,5, 1 y 0,5mM), siendo aun así los resultados aceptados por la OECD siempre y cuando sean positivos. Finalmente, por estos mismos problemas de precipitación, se decidió llevar a cabo solamente el modelo de cisteína propuesto por la OECD para estos casos (Tabla 2).

Por ello, solamente se preparó la recta de calibrado que cubría un rango de concentración de cisteína de 0,534mM a 0,0167mM haciendo disoluciones seriadas en tampón fosfato pH 7,5 con un 20% de acetonitrilo a partir de la disolución estándar de cisteína. Además, se incluyó un último estándar que solamente contenía el tampón de dilución como blanco de la curva patrón.

Respecto a los controles empleados para verificar el buen funcionamiento de la técnica, se emplearon soluciones de aldehído cinámico y DNCB (2,4-dinitroclorobenceno) como controles positivos, como controles negativos, soluciones de ácido láctico y 6-metilcumarina y además un control de referencia, Control C, con el fin de comprobar que el acetonitrilo empleado para disolver el químico a testar no afecta al porcentaje de disminución peptídica; cada cual con sus respectivas réplicas y estando los primeros a una concentración de 5mM, como indica la OECD y el Control C a 0,5mM.

Una vez preparadas e incubadas las pertinentes disoluciones y sus réplicas, el análisis de la disminución peptídica se llevó a cabo en un equipo de HPLC (Shimadzu 10AD) con una columna de fase reversa Zorbax SB-C-18 2,1mm x 100 mm x 3,5µm (Agilent, 861753-902) conectado a un detector UV (SPD-10AV VP UV-vis; Shimadzu 10AD) con el que medir la absorbancia a una longitud de onda de 220nm. Para llevarlo a cabo, se fijó un volumen de inyección de 10µL, manteniendo la columna a 30°C a un flujo de 0,35mL/min con un gradiente de fase móvil A (0,1% vol / vol TFA en agua) y fase móvil B (0,085% vol / vol TFA en acetonitrilo).

Por último, integrando el área bajo la curva del pico correspondiente al tiempo de retención de la cisteína en el cromatograma obtenido por el HPLC e interpolándola en la recta de calibrado, mediante la siguiente fórmula, se calculó el porcentaje de disminución peptídica de cada una de las muestras:

$$\%Disminución\ peptídica = \left[1 - \left(\frac{\text{Área del pico de la muestra}}{\text{Media del área del pico de los controles de referencia}} \right) \right] \cdot 100$$

Normalmente, para esta técnica se considerará que el compuesto a testar es sensibilizante si al realizar la media de las disminuciones peptídicas de cisteína y lisina da un valor superior al 6,38% según el marco de trabajo de los IATA con diferentes grados de reactividad como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Modelo de predicción del potencial sensibilizante de un compuesto según los porcentajes de disminución peptídica.

| Media de los % de disminución peptídica | Reactividad | Predicción |
|---|---------------|------------|
| 0% ≤ media ≤ 6,38% | Nula o mínima | Negativa |
| 6,38% < media ≤ 22,62% | Baja | Positiva |
| 22,62% ≤ media ≤ 42,47% | Moderada | |
| 42,47% ≤ media ≤ 100% | Alta | |

En los casos en los que el químico problema tiene el mismo tiempo de retención y se produce un fenómeno de co-elución y no se ha podido separar el péptido del químico, se considera que el resultado es “no concluyente”. A su vez, si existen problemas con el péptido de lisina, como en este caso, debe usarse el modelo de predicción de cisteína indicado en la Tabla 2, en el que para considerar a un compuesto sensibilizante debe superarse el umbral de 13,89% de disminución peptídica.

Tabla 2. Modelo de predicción de Cisteína.

| % Disminución peptídica de Cys | Reactividad | Predicción |
|--|---------------|------------|
| $0\% \leq \text{Cys}\% \leq 13,89\%$ | Nula o mínima | Negativa |
| $13,89\% < \text{Cys}\% \leq 23,09\%$ | Baja | Positiva |
| $23,09\% \leq \text{Cys}\% \leq 98,24\%$ | Moderada | |
| $98,24\% \leq \text{Cys}\% \leq 100\%$ | Alta | |

3.3. KeratinoSens™

Una vez alcanzada la confluencia recomendada por la OECD del 80-90%, para llevar a cabo esta técnica, las células fueron tripsinizadas con TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco, 12563029) y sembradas en tres placas opacas y una transparente todas de 96 pocillos a una densidad de 10000células/pocillo. Las siguientes 24h, las células fueron incubadas en medio DMEM al 9,1% de FCS, sin antibiótico alguno.

Se procedió a realizar las disoluciones y sus triplicados a distintas concentraciones de ambos antineoplásicos en medio DMEM al 9,1% de FCS sin antibiótico, de 1, 10, 10 y 1000ng/mL para Erlotinib y de 50, 100 y 150ng/mL para Imatinib; así como también se prepararon las diferentes disoluciones seriadas de aldehído cinámico (Sigma Aldrich, W228613) a 4, 8, 16, 32 y 64μM y de DNCB (2,4-Dinitroclorobenceno) (Sigma Aldrich, 237329-10G) a 7,8, 3,91, 1,95 y 0,98μM, es decir, de los controles positivos y de isopropanol (Sigma Aldrich, I9516-25ML) y de ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K), ambas a 1000μM, que serían los controles negativos. Así pues, se dejaron incubar las células con los compuestos a testar durante 48h a 37°C al 5% de CO₂. Además, a su vez como control del solvente empleado, se dejaron pocillos solamente con células en su medio sin los químicos en cuestión.

Para llevar a cabo el ensayo de la luciferasa en las placas opacas con el kit Luciferase Assay System 10-pack (Promega, E1501), primeramente, se aspiró el sobrenadante cuidadosamente y se lavaron las células dos veces con DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) (Biowest, L0615-500) con el fin de eliminar los posibles restos de medio que hubiesen quedado. Se añadieron a cada pocillo 20μL de la solución de lisis Passive Lysis 5X Buffer (Promega, E1941) previamente diluida a 1X y tras incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación, se añadieron 50μL de sustrato y rápidamente se midió la luminiscencia en el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech).

Estos experimentos fueron realizados en dos ocasiones independientes entre sí para cada uno de los compuestos a testar.

La inducción de la actividad luciferasa se obtuvo a partir de los datos obtenidos en el luminómetro mediante la fórmula:

$$\text{Actividad luciferasa inducida} = \frac{(L_{\text{muestra}} - L_{\text{blanco}})}{(L_{\text{solvente}} - L_{\text{blanco}})}$$

Siendo:

$L_{muestra}$, la lectura de la luminiscencia obtenida en un pocillo con antineoplásico.

L_{blanco} , la lectura de la luminiscencia obtenida en el pocillo que no contiene ni células ni compuesto.

$L_{solvente}$, la media de las lecturas de los pocillos que contienen células y solvente (DMSO) pero no compuesto (controles negativos).

Una vez calculada la actividad luciferasa inducida para cada pocillo, mediante el promedio de la inducción de las réplicas, se obtuvo la medida de la inducción de la actividad de la luciferasa máxima global ($I_{m\acute{a}x}$) para cada una de las concentraciones.

Con el fin de poder calcular la capacidad inductiva de la actividad luciferasa de cada compuesto, se calculó $EC_{1,5}$ mediante interpolación lineal según la siguiente ecuación:

$$EC_{1,5} = (C_b - C_a) \cdot \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

Siendo:

C_a , la menor concentración en μM con una actividad luciferasa inducida mayor de 1,5

C_b , la mayor concentración en μM con una actividad luciferasa inducida menor de 1,5

I_a , la actividad luciferasa inducida para la concentración más baja con una $I_{m\acute{a}x}$ mayor de 1,5

I_b , la actividad luciferasa inducida para la concentración más alta con una $I_{m\acute{a}x}$ menor de 1,5

Paralelamente al ensayo de expresión de la luciferasa, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad en la placa transparente restante, con el que se comprobó el grado de citotoxicidad de los dos antineoplásicos. Se cambió el sobrenadante de esta placa por 200 μL de DMEM al 1% de FCS sin antibióticos, además de añadirse a cada uno de los pocillos 27 μL de una solución de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide; bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) (Sigma Aldrich, M2128-1G) (5mg/mL en DPBS) y se dejó incubar en oscuridad durante 4h a 37°C al 5% de CO_2 . Una vez finalizado este período, se sustituyó el medio por 100 μL de DMSO (Sigma Aldrich, 34869-1L-M), transcurridos 10 minutos en agitación a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan) a 600nm.

A partir de las medidas obtenidas, se calculó la viabilidad celular según la fórmula:

$$Viabilidad = \frac{(V_{muestra} - V_{blanco})}{(V_{solvente} - V_{blanco})} \cdot 100$$

Siendo:

$V_{muestra}$, la lectura de la absorbancia de los pocillos con el compuesto a testar.

$V_{solvente}$, la lectura de la absorbancia del pocillo que solamente contiene células y solvente.

V_{blanco} , la lectura de la absorbancia del pocillo que no contiene ni células ni compuesto.

A continuación, empleando los valores de viabilidad obtenidos previamente para las distintas dosis testadas de ambos antineoplásicos, se calculó mediante interpolación lineal la concentración mínima necesaria de estos para obtener una viabilidad del 50 y del 30%, es decir IC_{50} e IC_{30} , respectivamente, empleando la siguiente fórmula:

$$IC_x = (C_b - C_a) \cdot \left(\frac{(100 - x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

Siendo:

x , el porcentaje de reducción a la concentración a calcular (50 y 30 para IC_{50} e IC_{30}).

C_a , la concentración más baja en μM con una reducción de la viabilidad superior al $x\%$.

C_b , la concentración más alta en μM con una reducción de la viabilidad inferior al $x\%$.

V_a , el porcentaje de viabilidad a la menor concentración con una reducción de la viabilidad superior al $x\%$ (C_a).

V_b , el porcentaje de viabilidad a la mayor concentración con una reducción de la viabilidad inferior al $x\%$ (C_b).

Posteriormente, los valores totales de IC_{50} e IC_{30} se obtuvieron calculando la media geométrica de cada una de las repeticiones, en este caso 2.

Para esta técnica se considera que el químico a testar es sensibilizante si todas las condiciones siguientes se dan en al menos 2 repeticiones del experimento independientes, en caso contrario se considerará no sensibilizante:

1. La $I_{m\acute{a}x}$ es superior a 1,5 y estadísticamente significativa en comparación con el control negativo (solvente, DMSO).
2. La viabilidad celular es superior al 70% para la concentración más baja con un $I_{m\acute{a}x}$ por encima de 1,5.
3. El $EC_{1,5}$ es inferior a 1000 μM .
4. Debe haber una correlación clara entre la dosis y la respuesta obtenida en la inducción de la luciferasa.

En caso de que no haya concordancia entre los experimentos, será necesario realizar un tercero y el resultado final será el que indique la mayoría.

3.4. h-CLAT

Al igual que para el Test de KeratinoSens™, se realizó de manera independiente dos veces el experimento.

Para empezar con la técnica de h-CLAT, el primer paso fue sembrar las células THP-1 en dos placas de 24 pocillos a una densidad de 500000 células/pocillo. Se dejaron incubar a 37°C al 5% de CO₂ durante media hora para facilitar su adaptación al medio y reducir el estrés celular al mínimo.

Mientras tanto se preparó suficiente volumen para hacer triplicados de cada una de las concentraciones a ensayar, es decir, de los controles positivos, DNCB a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sulfato de níquel (Sigma Aldrich, N4882-1KG) a 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de los controles negativos, ácido láctico a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e isopropanol a 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y una condición simplemente con células y medio; y por supuesto, las diferentes concentraciones de Erlotinib e Imatinib a 1, 2,5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el primero y 0,5, 1 y 5, el segundo. En todos los casos se añadieron 500 μL de disolución a 500 μL de células a cada pocillo y se incubaron 24h a 37°C al 5% de CO₂.

Tras la incubación con los antineoplásicos, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1500rpm a 4°C. Se procedió a eliminar el sobrenadante obtenido y a resuspender el pellet con las células en tampón de bloqueo (0,01g de Globina (Sigma- Aldrich, G2388-10G) en 100mL en *Staining Buffer* (Invitrogen, 00-4222-26)) para bloquear los receptores Fc, con el que se incubó

durante 15 minutos a 4°C. Durante este tiempo, se procedió a preparar las soluciones de los anticuerpos monoclonales anti-CD86 (Dako, F7205), anti-CD54 (Dako, F7143) y el del isotipo control de ratón IgG1 (Dako, X0927) conjugados con FITC (Isotiocianato de fluoresceína, señal de emisión a 525nm) con *Staining Buffer* en una proporción 3:25 para CD86 y una de 3:50 para CD54 e IgG, este último siendo empleado como control de isotipo. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió un anticuerpo a uno de los tres pocillos destinados a cada concentración o control y se volvieron a dejar en incubación a 4°C en oscuridad durante media hora más. Tras centrifugar y eliminar el sobrenadante, se hicieron dos lavados con 500µL de *Staining Buffer* y finalmente se resuspendió el pellet otra vez con 300µL de *Staining Buffer* y 2µL de yoduro de propidio (Sigma Aldrich, P4170-100MG) a cada uno de los eppendorfs como indicador de viabilidad celular (señal de emisión a 620nm).

Una vez terminado este proceso, se procedió a medir la intensidad de fluorescencia de FITC de CD86 y CD54 y la viabilidad celular mediante un citómetro de flujo (BD LSR Fortessa X-20). Y basándose en el valor de la MFI (*Mean Fluorescence Intensity*, Intensidad de Fluorescencia media), se calculó el valor de RFI (*Relative Fluorescence Intensity*, Intensidad de Fluorescencia Relativa) según la siguiente fórmula como indicador de la expresión de los marcadores de superficie CD86 y CD54:

$$RFI = \frac{MFI_{de\ células\ tratadas} - MFI_{de\ células\ tratadas\ con\ el\ isotipo\ control}}{MFI_{de\ células\ control\ con\ solvente} - MFI_{de\ las\ células\ control\ con\ el\ isotipo\ control}} \cdot 100$$

Y respecto a la viabilidad, fue calculada según la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \cdot 100$$

Para esta técnica, se considerará que un compuesto es sensibilizante cutáneo siempre y cuando en al menos uno de los dos experimentos independiente realizados cumpla que la RFI de CD86 sea mayor o igual al 150% a cualquier concentración testada y con una viabilidad celular mayor o igual al 50% y/o que la RFI de CD54 sea mayor o igual al 200% a cualquier concentración testada y con una viabilidad celular mayor o igual al 50%, en caso contrario, el compuesto será considerado como no sensibilizante.

A parte, opcionalmente, para los compuestos calificados como sensibilizantes cutáneos la OECD recomienda calcular según la siguiente fórmula los valores de las concentraciones a las cuales el químico en cuestión induce un RFI de 150 o 200 (EC, *Effective Concentration*), *EC150* para CD86 y *EC200* para CD54, para cada uno de los experimentos, siendo el valor final la media de estos.

$$EC150 = B_{dose} + \left[\frac{(150 - B_{RFI})}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \cdot (A_{dose} - B_{dose}) \right]$$

$$EC200 = B_{dose} + \left[\frac{(200 - B_{RFI})}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \cdot (A_{dose} - B_{dose}) \right]$$

Siendo:

A_{dose} , la menor concentración en µg/mL con un RFI superior a 150 para CD86 o a 200 para CD54

B_{dose} , la mayor concentración en µg/mL con un RFI inferior a 150 para CD86 o a 200 para CD54

A_{RFI} , el RFI de la menor concentración con un RFI superior a 150 para CD86 o a 200 para CD54

B_{RFI} , el RFI de la mayor concentración con un RFI inferior a 150 para CD86 o a 200 para CD54

3.5. Criterios de aceptación del potencial sensibilizante

Un compuesto será considerado como sensibilizante según la OECD siempre y cuando dé un resultado válido positivo para dos de las tres técnicas comentadas y para aceptar un resultado como válido, los resultados obtenidos deben cumplir una serie de requisitos para cada una de ellas.

DPRA

Para aceptar un experimento de DPRA como válido debe cumplir los siguientes requisitos (OECD 442C, 2015):

- La curva de calibración debe tener una $r^2 > 0,99$.
- La media del porcentaje de disminución peptídica de las réplicas del aldehído cinámico debe estar entre el 60,8 y 100% para la cisteína y su desviación estándar (SD) no debe superar el 14,9%. Esto último también debe aplicarse a los replicados de los compuestos químicos a testar.
- La media de la concentración peptídica de los replicados para cada uno de los controles de referencia en el solvente empleado, debe ser $0,50 \pm 0,05$ mM.
- El coeficiente de variación (CV) de las áreas de los picos del péptido para el control C en acetonitrilo debe ser inferior al 15%.

Test de ARE-Nrf2 Luciferasa mediante KeratinoSens™

Para aceptar un experimento de KeratinoSens™ como válido debe cumplir los siguientes requisitos (OECD 442D, 2015):

- La actividad luciferasa para el aldehído cinámico para al menos una de las concentraciones testadas entre 4 y $64 \mu\text{M}$ debe ser estadísticamente significativa superando el umbral de 1,5 por ejemplo usando un t-test.
- El $EC_{1,5}$ para el aldehído cinámico debe estar entre 7 y $30 \mu\text{M}$ y la media de la inducción de sus réplicas a $64 \mu\text{M}$ debe estar entre 2 y 8.
- El CV promedio de la luminiscencia del control negativo (solvente, DMSO) debe ser inferior al 20% en cada repetición, de lo contrario, los resultados deben ser descartados.

h-CLAT

Para aceptar un experimento de h-CLAT como válido debe cumplir los siguientes requisitos (OECD 442E, 2015):

- La viabilidad celular de los controles negativos empleados, tanto en medio como en solventes (DMSO) debe ser superior al 90%.
- La viabilidad celular del control positivo DNCB tiene que ser superior al 50% además de que sus valores de RFI para cada uno de los marcadores deben cumplir los criterios establecidos para considerar un resultado como positivo [$RFI_{CD86} \geq 150$ y $RFI_{CD54} \geq 200$].
- Tanto en DNCB como en medio, la relación de ambos marcadores de superficie respecto al control de isotipo (IgG) debe ser mayor del 50%.

- Respecto a los compuestos químicos testados, la viabilidad celular debe ser superior al 50%.

3.6. QSAR

Además, con el fin de complementar los resultados obtenidos por las técnicas previamente descritas, se realizó un análisis mediante la herramienta QSAR Toolbox versión 4.4.1 (2020) de la OECD empleando un flujo de trabajo automatizado. Primero, dado que se trata de químicos simples y no de mezclas, se insertó un identificador específico de cada antineoplásico en el primer módulo de *Input*, en este caso, el número CAS (*Chemical Abstract Services*) (Imatinib: 152459-95-5; Erlotinib: 183321-76-6). Después en el módulo *Data gap filling*, se seleccionó el modo de trabajo automático y el punto final de sensibilización cutánea con datos experimentales de pruebas de LLNA y GPMT (Prueba de Maximización del Conejillo de Indias) y se inició el proceso de predicción con estos parámetros. Para terminar, en el módulo *Report* se obtuvo un informe independiente para cada fármaco con el resultado de la predicción sobre el potencial de sensibilización cutánea de cada uno.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del ensayo de DPRA

Esta técnica, como ya se ha comentado previamente, hace uso de la capacidad que tienen los compuestos sensibilizantes de unirse a los grupos nucleofílicos de las proteínas transportadoras de la piel, es decir, aprovechando el primer evento clave de un proceso de sensibilización cutánea. De esta manera se pretende comprobar si los dos antineoplásicos problema, Imatinib y Erlotinib, son capaces de unirse a los péptidos sintetizados con tal fin de cisteína y lisina al poseer grupos nucleofílicos en su cadena lateral.

En este análisis en concreto, como ya se ha comentado en el apartado de materiales y métodos dedicado a esta técnica, solamente va a considerarse el modelo de predicción de cisteína propuesto por la OECD (Tabla 2) debido a problemas de precipitación inmediata a las concentraciones establecidas en el protocolo de la OECD y a la obtención de resultados no analizables para concentraciones inferiores en las disoluciones del péptido de lisina.

Respecto al antineoplásico Imatinib, se hicieron disoluciones a una concentración de 2,5 mM, 1mM y 0,5mM. La primera de ellas presentó una elevada precipitación imposibilitando su análisis y para el resto, aún solo considerando el modelo de cisteína, el resultado era no concluyente por un fenómeno de co-elución con el péptido empleado que impedía la integración del área del pico y por tanto, el cálculo del porcentaje de disminución peptídica.

En lo referente a Erlotinib, se hicieron disoluciones a 5, 2,5, 1 y 0,5mM. Para las dos primeras, los resultados fueron descartados por problemas de precipitación masiva, en cambio, para las otras dos disoluciones se obtuvieron lecturas analizables y con las que se cumplía los criterios de aceptación de la OECD, siendo los resultados obtenidos para las disoluciones de Erlotinib, de ácido láctico y 6-metilcumarina como controles negativos y de aldehído cinámico y de DNCB como controles positivos, los mostrados en la Figura 9:

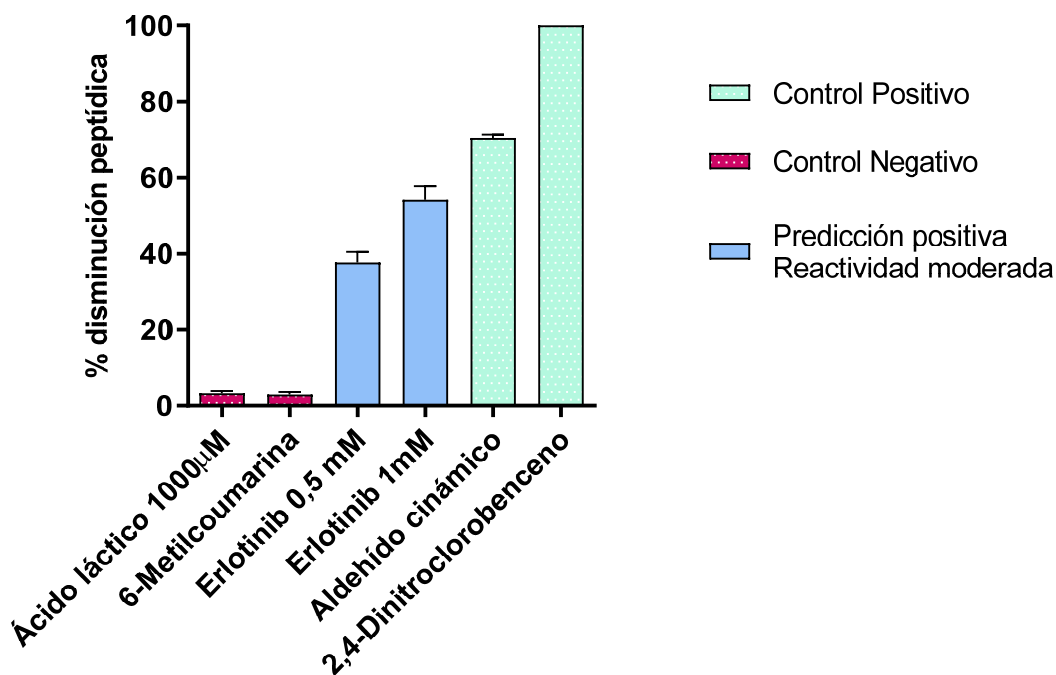


Figura 9. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib por DPRA. Se representan los valores de la media aritmética de las repeticiones \pm SD del porcentaje de disminución peptídica de Erlotinib a distintas concentraciones y de los diferentes controles por la técnica DPRA tras 24h de incubación con el péptido sintético de cisteína.

Como se puede observar en la figura anterior, al calcular los porcentajes de disminución peptídica para la cisteína, los valores de los controles positivos están muy por encima del umbral establecido de 13,89% de disminución peptídica, mientras que los negativos, no llegaron a alcanzarlo, como era de esperar. Respecto al fármaco en sí, el porcentaje medio de disminución peptídica para la disolución 0,5mM fue de 37,66% y para la de 1mM fue de 54,18%, las dos con una SD muy inferior al 14,9% establecido como requisito de aceptación de los resultados. Así pues, viendo que ambas concentraciones están dentro del rango de reactividad moderada según los criterios para este modelo (Tabla 2) se concluye que la predicción es positiva.

4.2. Resultados del ensayo KeratinoSens™

Mediante esta técnica se valora la capacidad de un compuesto de desencadenar el segundo evento clave de un proceso de sensibilización cutánea, es decir, la activación de los queratinocitos valiéndose del mecanismo de activación de la vía Keap1/Nrf2 ante un estrés oxidativo, detectable al emplear la línea transfectada KeratinoSens™, mediante la expresión del gen de la luciferasa.

Para Imatinib se testaron los respectivos controles positivos (ácido láctico e isopropanol) y negativos (DNCB y aldehído cinámico) con los que se obtuvieron los resultados esperados, indicando así la fiabilidad del experimento y las diluciones de fármaco a 50, 100 y 150ng/mL. En todas ellas, excepto para la menor, la $I_{máx}$ es superior o igual al umbral de 1,5, como se puede observar en la Figura 10A, cumpliéndose así la primera premisa de los criterios de aceptación para esta técnicas. La viabilidad para la menor concentración con una $I_{máx}$ superior a 1,5 supera el 70% y el valor de $EC_{1,5}$ para este compuesto es inferior a 1000µM, es decir, que se cumplen otros dos criterios de aceptación; y mediante la Figura 10B se confirma el cuarto criterio, una clara dependencia entre la dosis de fármaco y su efecto sobre la viabilidad celular y la respuesta obtenida por la luciferasa.

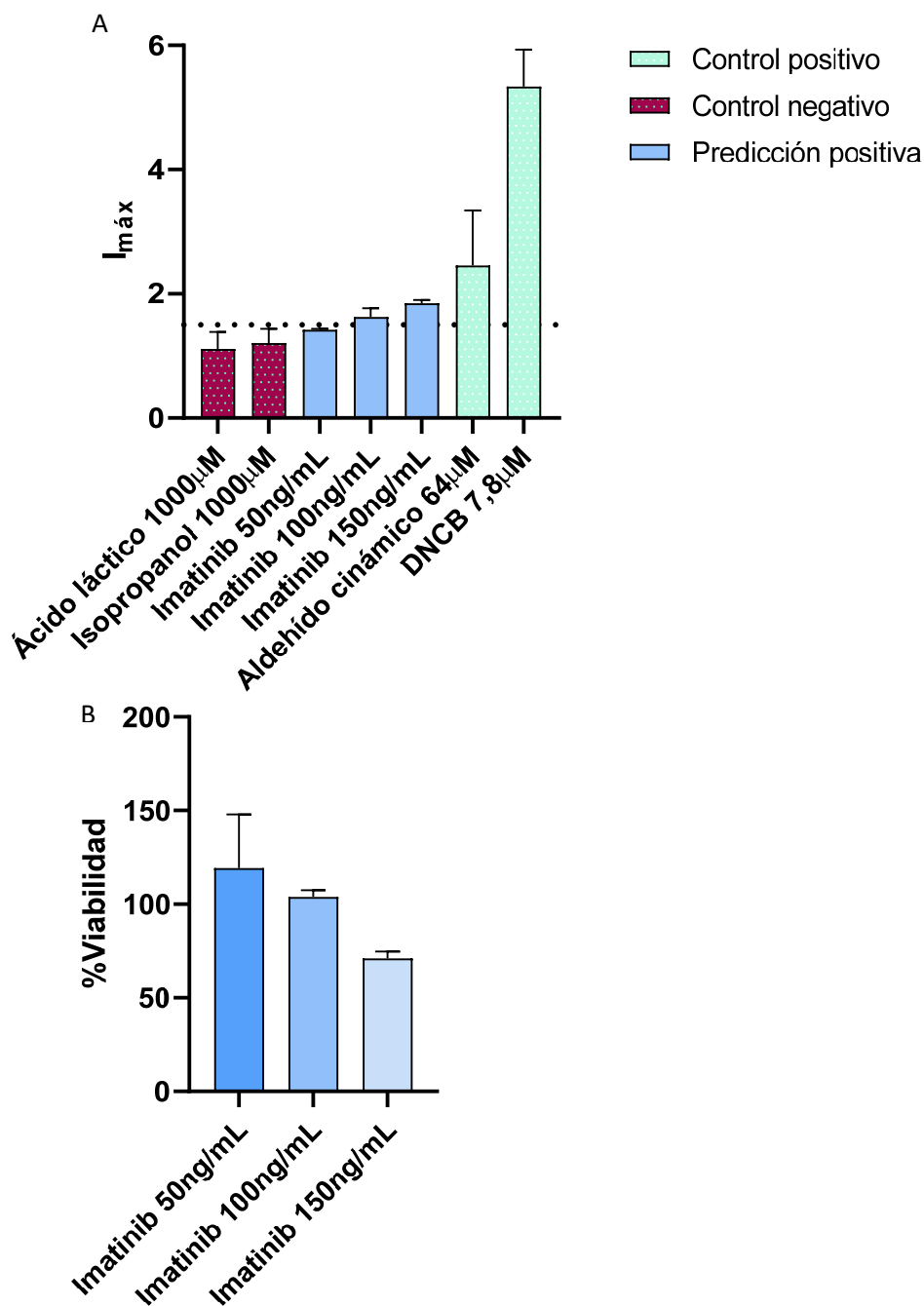


Figura 10. Análisis del potencial sensibilizante de Imatinib mediante KeratinoSens™. Efectos de Imatinib y de los respectivos controles para la línea celular KeratinoSens™ tras 48h de incubación. **A-** Se representan los valores de la media aritmética \pm SD de los dos experimentos independientes realizados para los valores de la inducción de la actividad de la luciferasa máxima global, $I_{m\acute{a}x}$. **B-** Se representan los valores de la media aritmética \pm SD de los dos experimentos independientes realizados para los valores de la viabilidad celular.

Puesto que el experimento cumple con los criterios de aceptación establecidos por la OECD ya mencionados, se puede afirmar que la predicción del potencial sensibilizante para este fármaco es positiva.

Para Erlotinib se testaron los respectivos controles positivos (ácido láctico e isopropanol) y negativos (DNCB y aldehído cinámico) con los que se obtuvo los resultados esperados, indicando así la fiabilidad del experimento y las diluciones de fármaco a 1, 10, 100 y 1000ng/mL. En este caso en ninguna de las concentraciones probadas se alcanza el umbral de 1,5 para la $I_{m\acute{a}x}$ (Figura

11A), en consecuencia no se puede saber el valor de $EC_{1,5}$ ni la viabilidad celular para la concentración más baja con una $I_{máx}$ superior al límite establecido. Solamente se puede decir que la respuesta obtenida para la expresión de la luciferasa es proporcional a la viabilidad (Figura 11B). Por tanto, en este caso, el descenso de la $I_{máx}$, se puede atribuir al menor número de células.

Puesto que no se cumplen los criterios básicos establecidos por la OECD para aceptar la predicción de esta prueba acerca del potencial sensibilizante de este compuesto no se puede afirmar que este compuesto tenga o no un potencial sensibilizante.

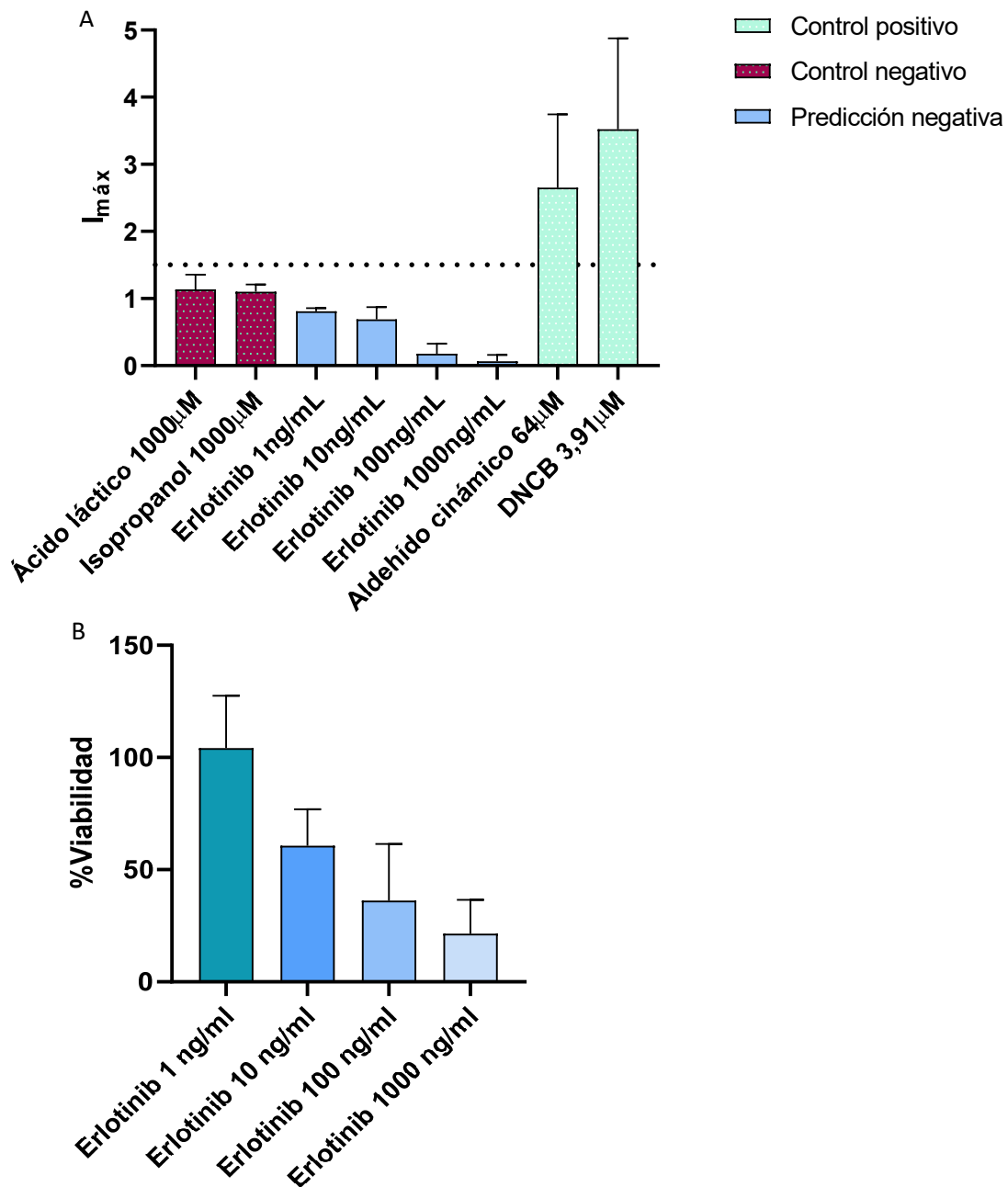


Figura 11. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib mediante KeratinoSens™. Efectos de Erlotinib y de los respectivos controles para la línea celular KeratinoSens™ tras 48h de incubación. **A-** Se representan los valores de la media aritmética \pm SD de los dos experimentos independientes realizados para los valores de la inducción de la actividad de la luciferasa máxima global, $I_{máx}$, así como el umbral establecido por la OECD con una línea horizontal discontinua. **B-** Se representan los valores de la media aritmética \pm SD de los tres experimentos independientes realizados para los valores de la viabilidad celular.

4.3. Resultados de la técnica h-CLAT

En esta técnica, como ya se ha comentado, se pretende medir la capacidad que tiene el fármaco de activar las células dendríticas, en este caso los monocitos de la línea celular THP-1, es decir, de desencadenar el tercer evento clave de una reacción de sensibilización cutánea.

Para Imatinib se testaron los controles pertinentes, isopropanol y ácido láctico como positivos y DNCB y sulfato de níquel como negativos, con los que se obtuvo el resultado esperado para ellos, confirmándose que el test se había realizado correctamente; respecto al antineoplásico en sí, se analizaron disoluciones a 500, 1000 y 5000 μ g/mL. En este caso siempre se obtuvo una viabilidad superior al 50% y superior al 90% en el caso los controles negativos, pero hasta llegar a la mayor de las concentraciones testadas no se aprecia una activación celular que sobrepase los umbrales establecidos por la OECD para la intensidad de fluorescencia relativa para los dos marcadores ($RFI_{CD86} \geq 150$ y $RFI_{CD54} \geq 200$), siendo la RFI_{CD86} de 183 y la RFI_{CD54} de 209 (Figura 12). Por todo esto se deduce que Imatinib sí tiene un potencial sensibilizante puesto que se cumplen los requisitos para dar por válida la predicción obtenida por esta técnica, así como un efecto dependiente de la dosis.

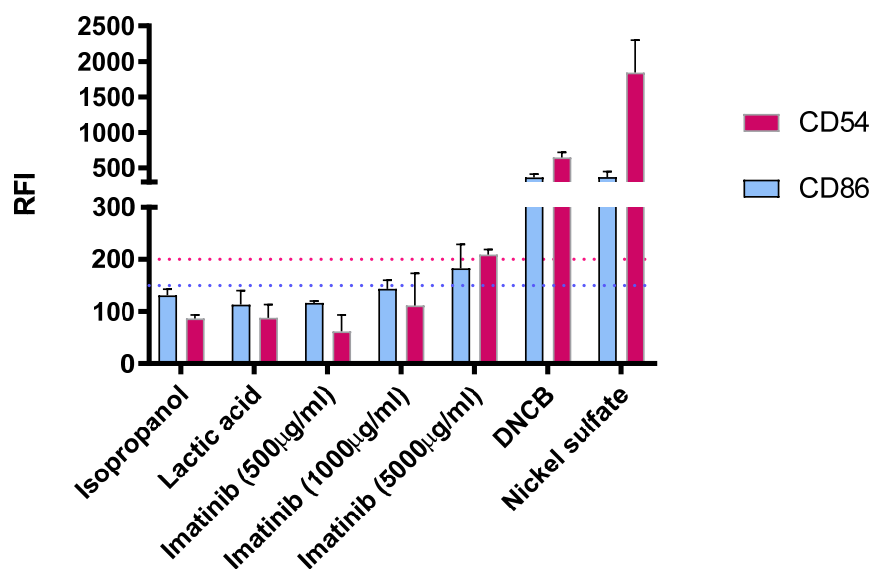


Figura 12. Análisis del potencial sensibilizante de Imatinib realizado por h-CLAT. Efecto de los controles e Imatinib sobre la línea celular THP-1 a distintas concentraciones después de su incubación durante 24h. Se representan la media aritmética de los valores de $RFI \pm SD$ de dos experimentos independientes. Se realizó tanto para CD56 como para CD54. El valor umbral establecido por la OECD para ambos marcadores se muestra mediante líneas discontinuas horizontales.

En lo referente a Erlotinib, se realizaron los mismos controles que para Imatinib y con los que también se obtuvo el resultado esperado para ellos, confirmándose que el test se realizó correctamente y en este caso, para el fármaco se llevaron a cabo disoluciones a 1, 2,5 y 5 μ g/mL. Siempre se obtuvo una viabilidad superior al 50% y superior al 90% en el caso de los controles negativos, pero en ninguna de las disoluciones testadas se alcanzan los estándares de $RFI_{CD86} \geq 150$ y $RFI_{CD54} \geq 200$ establecidos por la OECD (Figura 13). Puesto que se cumplen los criterios de aceptación de la prueba, la predicción acerca del potencial sensibilizante de Erlotinib es negativa.

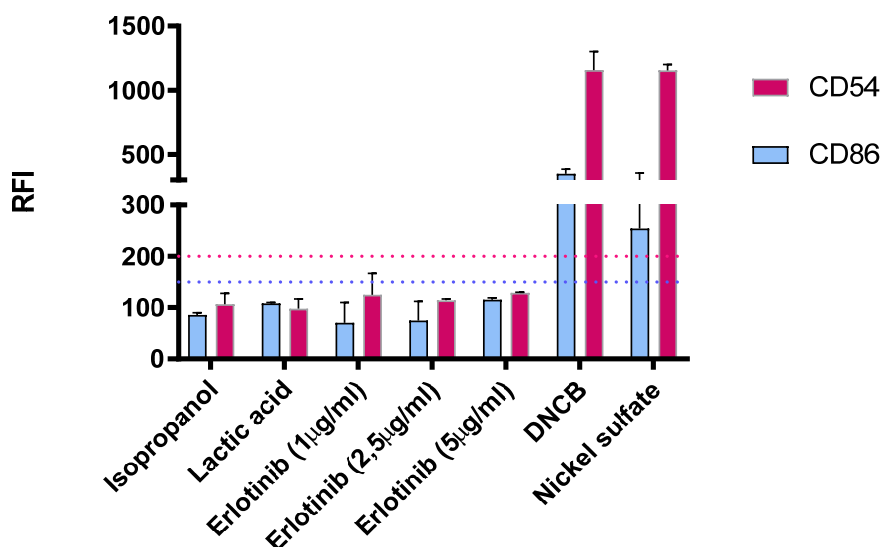


Figura 13. Análisis del potencial sensibilizante de Erlotinib realizado por h-CLAT. Efectos de los controles y Erlotinib sobre la línea celular THP-1 a distintas concentraciones después de su incubación durante 24h. Se representan la media aritmética de los valores de RFI \pm SD de dos experimentos independientes. Se realizó tanto para CD56 como para CD54. El valor umbral establecido por la OECD para ambos marcadores se muestra mediante líneas discontinuas horizontales.

4.4. Resultados obtenidos mediante QSAR Toolbox

Como ya se ha comentado previamente, con el fin de obtener información adicional de soporte a los test *in chemico* e *in vitro* sobre el potencial sensibilizante de los fármacos en cuestión, también se llevó a cabo un análisis *in silico* mediante el software de predicción QSAR Toolbox.

Esta herramienta de predicción, trabajando en modo de flujo automático, a partir de datos estructurales de la molécula y comparándolas con la información presente en diferentes bases de datos generó una predicción para cada uno de los antineoplásicos. En un principio compara distintas características del propio compuesto como sus grupos funcionales y su capacidad de unión a proteínas transportadoras de la piel, frente a compuestos ya evaluados. Después, la información obtenida es comparada con datos experimentales obtenidos por pruebas LLNA y GPMT recopilados en diferentes bases de datos especializadas en sensibilización cutánea. Los compuestos similares presentes en estos dos primeros análisis se clasifican como los análogos más similares al químico que se esté analizando. Como resultado, se obtiene un gráfico en el que se clasifica el químico a testar y los compuestos análogos como sensibilizantes o no sensibilizantes en función de Log K_{ow} (el coeficiente de reparto octanol-agua), de manera predeterminada por el modo de trabajo empleado, en el eje de abcisas. Como se puede observar en las figuras 13 y 14, las predicciones realizadas por esta herramienta para Imatinib y Erlotinib son negativa y positiva, respectivamente.

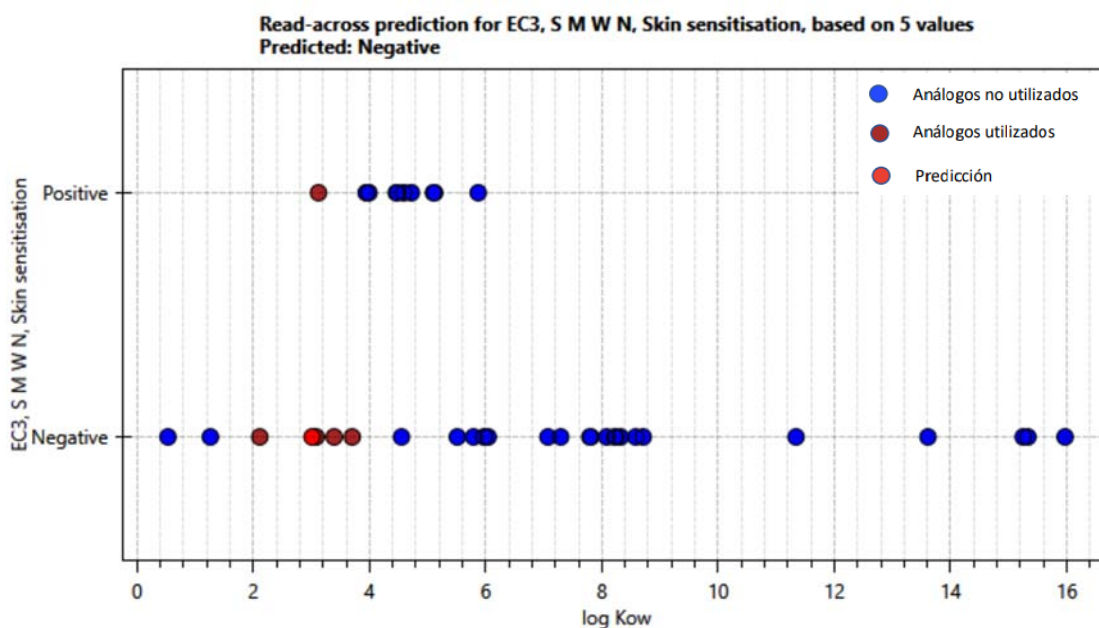


Figura 14. Predicción negativa de QSAR Toolbox de la OECD sobre potencial sensibilizante de Imatinib. Aparecen representados, en función del coeficiente de reparto octanol-agua, el antineoplásico a evaluar (puntos rojos) junto a los compuestos estructuralmente análogos con resultados experimentales sobre su potencial sensibilizante evaluado por LLNA y GPMT, tanto utilizados (puntos rojo oscuro) como no utilizados (puntos azules) en la comparación.

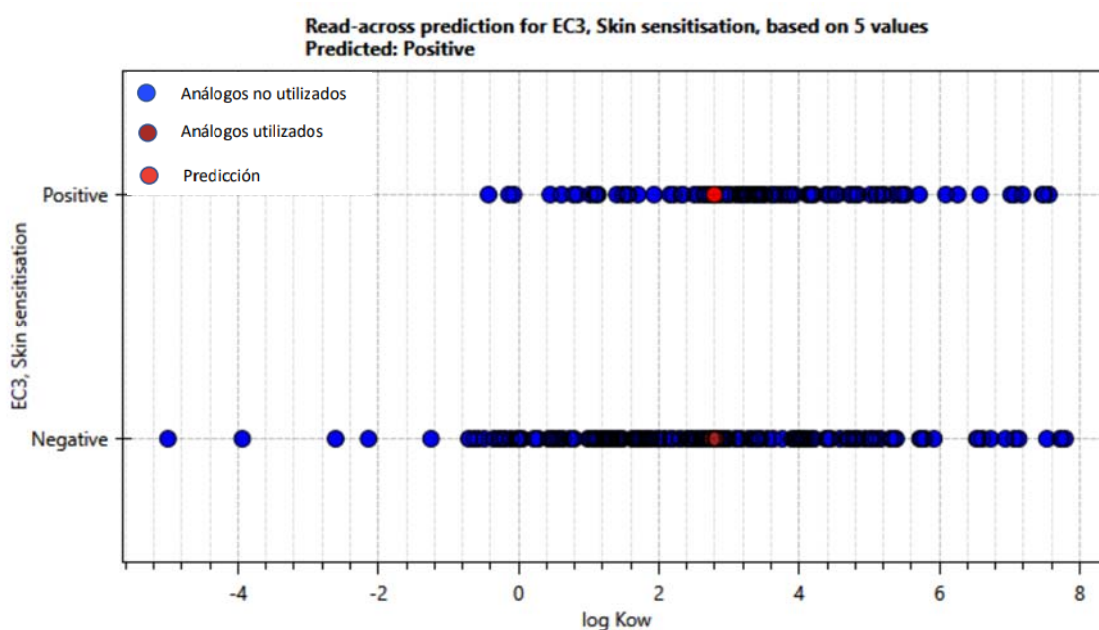


Figura 15. Predicción positiva de QSAR Toolbox de la OECD sobre potencial sensibilizante de Erlotinib. Aparecen representados, en función del coeficiente de reparto octanol-agua, el antineoplásico a evaluar junto a los compuestos estructuralmente análogos con resultados experimentales sobre su potencial sensibilizante evaluado por LLNA y GPMT, tanto utilizados como no en la comparación.

5. Discusión

Como se puede observar en la Tabla 3, al menos dos de las tres pruebas aceptadas por la OECD coinciden con sus resultados, al menos para Imatinib; de manera que, sin tener en cuenta nada más, Imatinib sería sensibilizante y respecto a Erlotinib, el resultado sería no-concluyente.

Tabla 3. Resumen de las predicciones obtenidas por las cuatro técnicas probadas

| | DPRa | KeratinoSens | h-CLAT | QSAR |
|-----------|----------------|----------------|----------|----------|
| Imatinib | No-concluyente | Positivo | Positivo | Negativo |
| Erlotinib | Positivo | No-concluyente | Negativo | Positivo |

Imatinib, en principio tiene un potencial moderado de sensibilización, a pesar del resultado no concluyente obtenido por la técnica DPRa, y, como se confirma con el análisis realizado mediante QSAR Toolbox, dicha capacidad no es por su estructura o grupos funcionales, sino más específicamente por las funciones en las que intervienen las dianas celulares hacia las que va dirigido este antineoplásico en concreto, como se señala más detalladamente en el punto 1.4.1 de este trabajo.

A su vez, los datos obtenidos mediante el test de KeratinoSensTM son coherentes con la literatura consultada respecto a la dosis y a los efectos adversos (Amitay-Laish et al., 2011; Jha et al., 2013), puesto que en dosis inferiores a 140mg/día en pacientes no se suelen observar, por lo que a las concentraciones testadas tampoco sería de esperar observar una citotoxicidad muy elevada (Figura 10B). Así como, los resultados obtenidos mediante h-CLAT (Figura 12) coinciden con los mecanismos en los que Imatinib interfiere descritos en Amitay-Laish et al., 2011. Es decir, que no necesariamente el fármaco tiene un efecto inmunogénico, sino que produce los efectos cutáneos adversos por el mero hecho de inhibir ciertos mecanismos en los que interfieren sus dianas como por ejemplo la renovación de melanocitos, la normal actividad de las células intersticiales de Cajal o la angiogénesis entre otros (Abbaspour Babaei et al., 2016; "Imatinib Mesylate - National Cancer Institute," 2006; Raica and Cimpean, 2010).

Respecto a Erlotinib, se podría considerar que es un compuesto sensibilizante si se tiene en cuenta el resultado del análisis realizado por DPRa y QSAR Toolbox y las pruebas aportadas por la literatura consultada en este trabajo (apartado 1.3.2).

Sin embargo, dado que la OECD no contempla la herramienta QSAR dentro de las dos de tres técnicas que tienen que dar el mismo resultado para considerar un compuesto como sensibilizante, se consideraría que la predicción obtenida para este fármaco es no concluyente, ya que al menos una de las pruebas negativas (KeratinoSensTM), no cumple los criterios de aceptación de los resultados. Esto es debido principalmente a la citotoxicidad demostrada en el análisis de la viabilidad del test de KeratinoSensTM (Figura 11B), resultado coincidente con la literatura consultada (Aw et al., 2018; Shi et al., 2016) y por ende, esperable, sobre todo si se tiene en cuenta en qué células se expresa EGFR, diana de Erlotinib, como por ejemplo las células endoteliales, queratinocitos indiferenciados y proliferantes de las capas basales y suprabasales de la epidermis, sebocitos y de la vaina radicular (Liu et al., 2013; Reyes-Habito and Roh, 2014), es decir que se inhiben procesos tales como la proliferación, migración y adhesión celular al unirse el fármaco a su diana (Riley and Desai, 2009). A su vez, como el mecanismo de acción de Erlotinib está basado en la inhibición por competitividad frente al ATP, impidiendo que fosforile el dominio TK de EGFR ("Tarceva, European Medicines Agency," 2018), y puesto que no provoca un estrés oxidativo como tal, la expresión de la luciferasa no se produciría al actuar Erlotinib, es decir, que podría considerarse que el resultado para esta técnica no es válido por la falta de adecuación de esta al mecanismo de acción de este fármaco en cuestión. Sería un factor a tener en cuenta para futuras modificaciones o adaptaciones de la técnica a los diferentes fármacos.

Por otro lado, aunque los resultados obtenidos por h-CLAT cumplen los requisitos de aceptación de la prueba establecidos por la OECD, contradicen completamente la literatura consultada, como por ejemplo a Macdonald et al., 2015; de manera que, se podría hipotetizar una posible explicación basándose en las limitaciones que puede tener esta técnica (OECD 442E, 2015), más concretamente en su dificultad para determinar correctamente el potencial sensibilizante de

aquellos compuestos que necesitan ser metabolizados previamente para desarrollar un potencial sensibilizante (pro-haptenos), por ejemplo, por enzimas de la vía del citocromo P450 siendo este el caso de Erlotinib (FICHA TECNICA ERLOTINIB TEVA 150 MG COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG; Li et al., 2007); en tales casos, esta técnica suele dar falsos negativos. Esto suele deberse a la pérdida de ciertas capacidades metabólicas por parte de las células, por el mero hecho de establecer y mejorar una línea celular, como es el caso de las dos empleadas en las técnicas *in vitro*, THP-1 y KeratinoSens™(Fabian et al., 2013).

Vistos los resultados obtenidos por las técnicas en general y la probada validez de su combinación con diferentes compuestos (Strickland et al., 2017, 2016; Urbisch et al., 2015; Yamamoto et al., 2019) se podría considerar que son excelentes sustitutas del testado en animales para predecir el potencial sensibilizante de compuestos químicos, al menos a primera vista; sin embargo, aquí se ha hecho patente un punto ciego para estas técnicas, en muchos casos queda obviado el mecanismo de acción seguido por el químico o su diana molecular y en cómo todo esto afecta a las células empleadas y al resultado reportado por ellas, siendo este el caso por ejemplo de Erlotinib, cuyo resultado, si no se tuviesen en cuenta todos estos factores, se diría que no es sensibilizante contradiciendo toda la bibliografía consultada; todo ello consecuencia de ser técnicas pensadas para fármacos de uso tópico, no sistémico como es el caso de los antineoplásicos, no está optimizado para compuestos que necesitan ser metabolizados previamente, es decir, necesita de ciertas modificaciones como las ya mencionadas o la realización de un ensayo paralelo con el metabolito sistémico final o incluso, en un microambiente tumoral no limitándose solamente a la línea celular establecida para poder ser estandarizadas como sustitutas definitivas del testado animal.

Aun así, pese a los resultados no concluyentes obtenidos, desde un punto de vista clínico, dado que hay un amplio rango de efectos adversos y que no aparecen ni los mismos ni todos en todos los pacientes tratados con terapias dirigidas, tanto las aquí comentadas como otras, el empleo de las técnicas comentadas previamente podrían suponer un método de predicción y pronta toma de medidas preventivas contra los citados efectos secundarios cutáneos si se llevasen a cabo con células propias de cada paciente, de manera que supusiese para ellos no solo una mejora en su calidad de vida durante el tratamiento sino uno mejor y un ahorro en recursos tanto para los propios pacientes como para el sistema sanitario al evitar tener que suspender la administración de tratamientos a mitad de estos y sustituirlos por otros, o reducir la dosis y hacer que el paciente esté tratándose durante más tiempo. De manera que, en una situación ideal, y económicamente poco factible, la aplicación de estas técnicas de forma habitual y personalizada podría suponer un gran avance para evitar las reacciones adversas de sensibilización cutánea antes siquiera de que se manifieste síntoma alguno, a la vez que prevendría la aparición de posibles secuelas al decidir con antelación medidas profilácticas para tal fin.

6. CONCLUSIÓN

- Para el antineoplásico Imatinib, pese al resultado no concluyente obtenido por la técnica *in chemico* DPRA, teniendo en cuenta el resto de técnicas *in vitro* aceptadas por la OECD, KeratinoSens™ y h-CLAT y el resultado obtenido a través de QSAR Toolbox *in silico*, se ha concluido un potencial sensibilizante moderado, coincidiendo así con la literatura consultada en la que se muestran los efectos adversos sufridos por los pacientes y que remiten al retirar el tratamiento con este fármaco.
- Para el antineoplásico Erlotinib se ha obtenido una predicción no concluyente, no hay dos de las tres pruebas aceptadas por la OECD que den el mismo resultado, posiblemente por una inadecuación de las técnicas KeratinoSens y de h-CLAT a este tipo de fármacos, ya que contradice completamente tanto la predicción realizada mediante

la herramienta QSAR Toolbox, como la literatura consultada, en la que se da fe de la elevada frecuencia de los efectos adversos padecidos por los pacientes y de su remisión al suprimir el tratamiento con Erlotinib.

- Respecto al potencial de la combinación de las cuatro técnicas comentadas como posibles sustitutos de los testados en animales de compuestos químicos resulta obvio su acierto, aunque deberían realizarse cambios que subsanasen las limitaciones de las técnicas que aquí se han podido apreciar, con el fin de obtener resultados confiables en un mayor número de químicos, con diferentes vías de administración y diferentes mecanismos de acción.
- En el caso concreto de los antineoplásicos que son terapias dirigidas, dado que están diseñados para atacar a ciertas células, debería considerarse tener en cuenta más factores como por ejemplo sus células diana o sus mecanismos de acción para mejorar estas técnicas y con ello su capacidad predictiva de sensibilización cutánea.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbaspour Babaei, M., Kamalidehghan, B., Saleem, M., Huri, H.Z., Ahmadipour, F., 2016. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 2443–2459. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S89114>
- Abouantoun, T.J., MacDonald, T.J., 2009. Imatinib blocks migration and invasion of medulloblastoma cells by concurrently inhibiting activation of platelet-derived growth factor receptor and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1137–1147. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0889>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *The Molecular Basis of Cancer-Cell Behavior*. Mol. Biol. Cell 4th Ed.
- Amitay-Laish, I., Stemmer, S.M., Lacouture, M.E., 2011. Adverse cutaneous reactions secondary to tyrosine kinase inhibitors including imatinib mesylate, nilotinib, and dasatinib. *Dermatol. Ther.* 24, 386–395. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2011.01431.x>
- Arora, B., Kumar, L., Sharma, A., Wadhwa, J., Kochupillai, V., 2004. Pigmentary changes in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 15, 358–359. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh068>
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT): I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. In Vitro* 20, 767–773. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.10.012>
- Aw, D.C.-W., Tan, E.H., Chin, T.M., Lim, H.L., Lee, H.Y., Soo, R.A., 2018. Management of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-related cutaneous and gastrointestinal toxicities. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* 14, 23–31. <https://doi.org/10.1111/ajco.12687>
- Chang, K.K., Yoon, C., Yi, B.C., Tap, W.D., Simon, M.C., Yoon, S.S., 2018. Platelet-derived growth factor receptor- α and - β promote cancer stem cell phenotypes in sarcomas. *Oncogenesis* 7. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0059-1>
- Chu, S., Holtz, M., Gupta, M., Bhatia, R., 2004. BCR/ABL kinase inhibition by imatinib mesylate enhances MAP kinase activity in chronic myelogenous leukemia CD34+ cells. *Blood* 103, 3167–3174. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1271>

- Cross, S.A., Lyseng-Williamson, K.A., 2007. In Relapsed or Refractory Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia 10.
- Demetri, G.D., von Mehren, M., Blanke, C.D., Van den Abbeele, A.D., Eisenberg, B., Roberts, P.J., Heinrich, M.C., Tuveson, D.A., Singer, S., Janicek, M., Fletcher, J.A., Silverman, S.G., Silberman, S.L., Capdeville, R., Kiese, B., Peng, B., Dimitrijevic, S., Druker, B.J., Corless, C., Fletcher, C.D.M., Joensuu, H., 2009. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate in Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa020461>
- Eaby-Sandy, B., Lynch, K., 2014. Side Effects of Targeted Therapies: Rash. *Semin. Oncol. Nurs.* 30, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2014.06.001>
- Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R., 2013. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization in vitro. *Arch. Toxicol.* 87, 1683–1696. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1090-9>
- FICHA TECNICA ERLOTINIB TEVA 150 MG COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/83421/FT_83421.html
- FICHA TECNICA IMATINIB SANDOZ 400 MG COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA EFG https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/80784/FichaTecnica_80784.html
- Gallagher-Colombo, S.M., Miller, J., Cengel, K.A., Putt, M.E., Vinogradov, S.A., Busch, T.M., 2015. Erlotinib pretreatment improves photodynamic therapy of non-small cell lung carcinoma xenografts via multiple mechanisms. *Cancer Res.* 75, 3118–3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3304>
- GHS (Rev.8) (2019) - Transport - UNECE https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev08/08files_e.html
- Goebel et al., 2012. Guiding principles for the implementation of non-animal safety assessment approaches for cosmetics: Skin sensitisation https://www.researchgate.net/publication/221870390_Guiding_principles_for_the_implementation_of_non-animal_safety_assessment_approaches_for_cosmetics_Skin_sensitisation
- Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e | AccessMedicina | McGraw-Hill Medical <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1717>
- Hsiao, L.-T., Chung, H.-M., Lin, J.-T., Chiou, T.-J., Liu, J.-H., Fan, F.S., Wang, W.-S., Yen, C.-C., Chen, P.-M., 2002. Stevens–Johnson syndrome after treatment with STI571: a case report. *Br. J. Haematol.* 117, 620–622. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03499.x>
- Imatinib Mesylate - National Cancer Institute, 2006.
- Jha, P., D, H., Jain, N., Singh, A.K., 2013. Imatinib-induced Stevens-Johnsons syndrome. *BMJ Case Rep.* 2013. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-007926>
- Kang, Z.-J., Liu, Y.-F., Xu, L.-Z., Long, Z.-J., Huang, D., Yang, Y., Liu, B., Feng, J.-X., Pan, Y.-J., Yan, J.-S., Liu, Q., 2016. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin. J. Cancer* 35. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>
- Kilic, T., Alberta, J.A., Zdunek, P.R., Acar, M., Iannarelli, P., O’Reilly, T., Buchdunger, E., Black, P.M., Stiles, C.D., 2000. Intracranial Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Glioblastoma Cell Growth by an Orally Active Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class. *Cancer Res.* 60, 5143–5150
- Li, J., Zhao, M., He, P., Hidalgo, M., Baker, S.D., 2007. Differential Metabolism of Gefitinib and Erlotinib by Human Cytochrome P450 Enzymes. *Clin. Cancer Res.* 13, 3731–3737. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0088>
- Liu, C., Zhao, W., Meng, W., Zhao, T., Chen, Y., Ahokas, R.A., Liu, H., Sun, Y., 2014. Platelet-derived growth factor blockade on cardiac remodeling following infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 397, 295–304. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2197-x>

- Liu, H., Wu, Y., Lv, T., Yao, Y., Xiao, Y., Yuan, D., Song, Y., 2013. Skin Rash could predict the response to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor and the prognosis for patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS ONE 8, e55128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055128>
- Lozano-Aponte, J., Scior, T., 2012. ¿Qué sabe Ud. acerca de...QSAR? Rev Mex Cienc Farm 3.
- Macdonald, J.B., Macdonald, B., Golitz, L.E., LoRusso, P., Sekulic, A., 2015. Cutaneous adverse effects of targeted therapies. J. Am. Acad. Dermatol. 72, 203–218. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.07.032>
- Mascia, F., Lam, G., Keith, C., Garber, C., Steinberg, S.M., Kohn, E., Yuspa, S.H., 2013. Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. Sci. Transl. Med. 5, 199ra110. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005773>
- Mascia, F., Mariani, V., Girolomoni, G., Pastore, S., 2003. Blockade of the EGF Receptor Induces a Deranged Chemokine Expression in Keratinocytes Leading to Enhanced Skin Inflammation. Am. J. Pathol. 163, 303–312.
- McClelland, C.M., Harocopos, G.J., Custer, P.L., 2010. Periorbital edema secondary to imatinib mesylate. Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ 4, 427–431.
- OECD (2010), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>.
- OECD (2010), Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>.
- OECD (2014). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Series on Testing and Assessment, No. 168, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>
- OECD (2018), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>.
- OECD (2018), Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>.
- OECD (2018), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>.
- OECD (2020), Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>.
- Ohishi, J., Aoki, M., Nabeshima, K., Suzumiya, J., Takeuchi, T., Ogose, A., Hakozaiki, M., Yamashita, Y., Iwasaki, H., 2013. Imatinib mesylate inhibits cell growth of malignant peripheral nerve sheath tumors in vitro and in vivo through suppression of PDGFR- β . BMC Cancer 13, 224. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-224>
- Pazhouhandeh, M., Samiee, F., Boniadi, T., Khedmat, A.F., Vahedi, E., Mirdamadi, M., Sigari, N., Siadat, S.D., Vaziri, F., Fateh, A., Ajorloo, F., Tafsiri, E., Ghanei, M., Mahboudi, F., Rahimi Jamnani, F., 2017. Comparative Network Analysis of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Smokers for Representing Potential Therapeutic Targets. Sci. Rep. 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14195-1>

- Petzer, A.L., Wolf, D., Fong, D., Lion, T., Dyagil, I., Masliak, Z., Bogdanovic, A., Griskevicius, L., Lejniece, S., Goranov, S., Gercheva, L., Stojanovic, A., Peytchev, D., Tzvetkov, N., Griniute, R., Oucheveva, R., Ulmer, H., Kwakkelstein, M., Rancati, F., Gastl, G., 2010. High-dose imatinib improves cytogenetic and molecular remissions in patients with pretreated Philadelphia-positive, BCR-ABL-positive chronic phase chronic myeloid leukemia: first results from the randomized CELSG phase III CML 11 “ISTAHIT” study. *Haematologica* 95, 908–913. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.013979>
- Pichler, W.J., 2019. Immune pathomechanism and classification of drug hypersensitivity. *Allergy* 74, 1457–1471. <https://doi.org/10.1111/all.13765>
- PubChem, n.d. Erlotinib <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/176870>
- Raica, M., Cimpean, A.M., 2010. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals* 3, 572–599. <https://doi.org/10.3390/ph3030572>
- REGLAMENTO (CE) Nº 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos. Recuperado de <https://www.boe.es/doue/2009/342/L00059-00209.pdf>
- Reyes-Habito, C.M., Roh, E.K., 2014. Cutaneous reactions to chemotherapeutic drugs and targeted therapies for cancer. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71, 203.e1-203.e12. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.04.014>
- Riley, L.B., Desai, D.C., 2009. The Molecular Basis of Cancer and the Development of Targeted Therapy. *Surg. Clin. North Am.* 89, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2008.09.016>
- Rosell, R., Taron, M., Reguart, N., Isla, D., Moran, T., 2006. Epidermal Growth Factor Receptor Activation: How Exon 19 and 21 Mutations Changed Our Understanding of the Pathway. *Clin. Cancer Res.* 12, 7222–7231. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0627>
- Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Suzuki, H., 2007. Prediction of preservative sensitization potential using surface marker CD86 and/or CD54 expression on human cell line, THP-1. *Arch. Dermatol. Res.* 298, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s00403-006-0714-9>
- Schwöbel, J., Madden, J., Cronin, M., 2011. Application of a chemical reactivity database to predict toxicity for reactive mechanisms. *J. Cheminformatics* 3, P18. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-S1-P18>
- Shi, C.R., Nambudiri, V.E., 2018. Imatinib-induced psoriasiform eruption in a patient with chronic myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* 93, 467–468. <https://doi.org/10.1002/ajh.24894>
- Shi, V.J., Levy, L.L., Choi, J.N., 2016. Cutaneous manifestations of nontargeted and targeted chemotherapies. *Semin. Oncol.* 43, 419–425. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.02.018>
- Steffens, M., Paul, T., Hichert, V., Scholl, C., von Mallek, D., Stelzer, C., Sörgel, F., Reiser, B., Schumann, C., Rüdiger, S., Boeck, S., Heinemann, V., Kächele, V., Seufferlein, T., Stingl, J., 2016. Dosing to rash? – The role of erlotinib metabolic ratio from patient serum in the search of predictive biomarkers for EGFR inhibitor-mediated skin rash. *Eur. J. Cancer* 55, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.022>
- Strickland, J., Zang, Q., Kleinstreuer, N., Paris, M., Lehmann, D.M., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Lowit, A., Allen, D., Casey, W., 2016. Integrated Decision Strategies for Skin Sensitization Hazard. *J. Appl. Toxicol. JAT* 36, 1150–1162. <https://doi.org/10.1002/jat.3281>
- Strickland, J., Zang, Q., Paris, M., Lehmann, D.M., Allen, D., Choksi, N., Matheson, J., Jacobs, A., Casey, W., Kleinstreuer, N., 2017. Multivariate models for prediction of

- human skin sensitization hazard. *J. Appl. Toxicol.* JAT 37, 347–360. <https://doi.org/10.1002/jat.3366>
- Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., 2013. Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38, 599–609. <https://doi.org/10.2131/jts.38.5990.20>.
 - Tarceva, European Medicines Agency, 2018. Eur. Med. Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/tarceva>
 - Terapias dirigidas contra el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer, 2020.
 - The OECD QSAR Toolbox – OECD, <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm> (accessed 9.17.20)
 - Togashi, Y., Hayashi, H., Nakagawa, K., Nishio, K., 2014. Clinical utility of erlotinib for the treatment of non-small-cell lung cancer in Japanese patients: current evidence. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 1037–1046. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S50358>
 - Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 71, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.008>
 - Valeyrie, L., Bastuji-Garin, S., Revuz, J., Bachot, N., Wechsler, J., Berthaud, P., Tulliez, M., Giraudier, S., 2003. Adverse cutaneous reactions to imatinib (STI571) in Philadelphia chromosome-positive leukemias: A prospective study of 54 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 201–206. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.44>
 - Wang, L.-X., Yang, X., Yue, Y., Fan, T., Hou, J., Chen, G.-X., Liang, M.-Y., Wu, Z.-K., 2017. Imatinib attenuates cardiac fibrosis by inhibiting platelet-derived growth factor receptors activation in isoproterenol induced model. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178619>
 - Yamamoto, Y., Fujita, M., Wanibuchi, S., Sato, A., Akimoto, M., Katsuoka, Y., Ono, A., Kasahara, T., 2019. Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events. *J. Toxicol. Sci.* 44, 585–600. <https://doi.org/10.2131/jts.44.585>