

Universitat Politècnica de València

Departamento de Química, Universitat Politècnica de València (UPV)  
Unidad Mixta de Investigación UPV – Instituto de Investigación Sanitaria  
(IIS) La Fe, Hospital La Fe



# **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL FOTOQUÍMICO Y FOTOBIOLÓGICO DE LOS INHIBIDORES DE LA POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA**

Tesis doctoral

Alejandro Mateos Pujante

Dirigida por:

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Dra. María Consuelo Jiménez Molero

Valencia, junio 2023





Dña. M<sup>a</sup> CONSUELO JIMÉNEZ MOLERO, catedrática de universidad de la Universitat Politècnica de València, y Dña. INMACULADA ANDREU ROS, profesora titular de universidad de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada: “Evaluación del potencial fotoquímico y fotobiológico de los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa” ha sido desarrollada por ALEJANDRO MATEOS PUJANTE bajo su dirección, en el Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València y en la unidad mixta de investigación UPV – Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital la Fe, para optar al grado de doctor en Química por la Universitat Politècnica de València.

Fdo. Dña. Consuelo Jiménez Molero

Fdo. Dña. Inmaculada Andreu Ros



## Agradecimientos

Tras la realización de toda una vida académica, un grado, un máster y, con la presente tesis doctoral, se cierra el viaje que, sin lugar a dudas, ha sido hasta el momento el más arduo de mi vida. Un capítulo que comenzó hace casi once años con una matrícula universitaria y que hoy, finalmente ha llegado el momento de cerrarlo. Un camino selvático plagado de rosas y espinas, de valles tranquilos, terrenos escarpados y cuestas abruptas en el que, indudablemente, sin la guía y el apoyo de todas aquellas personas que me han acompañado en esta experiencia, no habría sido posible llegar hasta aquí. Es por ello que estas breves palabras van dedicadas a todos ellos.

Me gustaría agradecer a la Generalitat Valenciana y al Fondo Social Europeo por la ayuda predoctoral recibida para la realización de la presente tesis doctoral (ACIF/2018/153)

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras que me han formado durante toda mi trayectoria académica.

A mi apreciada directora la profesora Dra. María Consuelo Jiménez Molero por su incansable tesón y afán por enseñar, la cual me ha acompañado desde mis primeros pasos por la universidad en las primeras clases de química-física hasta la realización de este trabajo. A pesar de todos los varapalos que hemos tenido durante este proyecto, en ningún momento dudaste de que, al final, llegaríamos a buen puerto.

A mi gran estimada directora la profesora Dra. Inmaculada Andreu Ros, la cual me ha abierto las puertas de lo que sin duda ha sido la experiencia más emocionante de mi formación: los ensayos celulares *in vitro*. No solo me has enseñado, guiado y permitido crecer en un mundo que me era totalmente desconocido, sino que, además, hemos crecido y conseguido nuestros objetivos juntos. Me hace especial ilusión haber sido testigo de cómo una persona, tras tanto esfuerzo y dedicación,

haya conseguido la tan ansiada y merecida plaza de profesor titular. Y espero que, de forma superficial, haber contribuido a ello.

A pesar de no figurar directamente en esta tesis, su labor sí ha resultado imprescindible en este trabajo. Gracias a la Dra. Victoria Vendrell Criado por su formación, apoyo y ser mi mentora durante la realización de mi trabajo fin de máster y de esta tesis, por supuesto.

También agradecer al profesor Dr. Ignacio Vayá y al profesor Dr. Raúl Pérez por su apoyo y consejo en los pequeños problemillas técnicos que me han ido surgiendo durante la realización de esta tesis.

Por supuesto agradecer a la unidad de microscopía del IIS La Fe y, en especial, a la Dra. M<sup>a</sup> Pilar Marín Muela por su inestimable ayuda en el campo de la microscopía, la cual ha sido de vital importancia para el desarrollo de este trabajo. Ha sido todo un verdadero placer poder haber trabajado a tu lado.

En segundo lugar, me gustaría agradecer a mis padres, Antonia y José Luis, por su inestimable apoyo y todos sus incansables esfuerzos en intentar hacerme la vida más fácil. A ti mamá, por tu infinita paciencia y perseverancia para luchar contra las adversidades y, por seguir adelante a mi lado ante todos los obstáculos que se pongan por delante. Y a ti papá, por tu asombrosa capacidad para mantenerte firme y sereno ante las adversidades de la vida. Sois sin lugar a dudas el mejor espejo en el que una persona podría verse jamás reflejado y, sin vuestro apoyo y confianza incondicionales, quizás nunca hubiese llegado hasta el final.

En tercer lugar, a todos mis amigos y compañeros de laboratorio que me han estado acompañando durante todos estos años.

A mis compañeros del departamento Jorge, Dani, Lorena, Arianna y Jorge por hacerme la estancia más llevadera en los momentos más duros.

A Lorena, una de mis amigas y compañeras más veteranas que me lleva acompañando desde los inicios de nuestra aventura universitaria y con la he crecido y evolucionado felizmente a su lado.

A Arianna, *piccola mia*, por reír juntos cuando el mundo a nuestro alrededor parecía venirse abajo y por ser la persona risueña y llena de ilusión por las pequeñas cosas de la vida que todo el mundo debería tener a su lado.

A Jorge, por compartir una pequeña parte de tu mundo conmigo y vivirlo junto a mí, por no permitir que me perdiese entre la frustración de mis experimentos y arrojar un poco de luz entre espectros y señales de RMN sin aparente lógica.

Por supuesto, a mi queridísima amiga Gemma, con la que me he embarcado en este viaje de vértigo carrera universitaria ¿Cómo hubiésemos vivido toda esta locura si no nos hubiésemos sentado juntos aquella clase de Wolfram Mathematica? Sin duda es una pregunta cuya respuesta no me interesa lo más mínimo, porque todos los recuerdos que he podido construir junto a ti durante todos estos años son el catalizador más valioso de este mundo.

Como olvidarse de mi querida Alicia, la incansable, la inquebrantable, la super mujer que lo podía y puede con todo lo que se le venga encima.

A mis queridos amigos y compañeros del hospital, aliados y *partners in crime* con nuestras queridas celulitas.

A Patri por ser la aprendiz más espectacular que jamás ha tenido nunca un laboratorio en la vida.

A Guillem por ser el liante número uno de todo el instituto y por brindarnos un momento de claridad cuando no entendíamos absolutamente nada de lo que pasaba delante de nuestras placas.

A Manu por ser la cabeza loca con más ilusión por comerse el mundo que he conocido.

A Polina por ser las mejores manos que me han auxiliado, acompañado y apoyado a lo largo de todos estos años.

A Quique por su radiante sonrisa que se contagia incluso hasta en los momentos más agobiantes, por todas y cada una de sus fugaces (y no tan fugaces) visitas al 6.12 y por sus infinitas historias que cautivan desde la primera hasta la última palabra.

Por supuesto, a uno de mis tesoros más valiosos de mi vida. A mi inestimable amiga y compañera Mery. A la que, sin lugar a dudas, el simple hecho de conocerla y poder haber trabajado a su lado ha sido uno de los regalos más maravillosos que he tenido en mi vida. Gracias por ser mis ojos cuando mi vista se nublaba, por ser mi bastón cuando mis piernas flaqueaban, el camino por el que andar cuando todo a mi alrededor se derrumbaba y una brisa de alivio cuando mis propios pensamientos me asfixiaban. Sin lugar a dudas, esta tesis nos pertenece a ambos, pues entre sus líneas, sus imágenes y su portada hay una parte de tu esencia que ha sido vital para dar forma a esta tesis.

Y finalmente, quería dedicar unas últimas palabras a esas dos personas que me han acompañado a lo largo de casi toda mi vida. Las que a veces pienso que me conocen mejor que yo mismo. Gracias a vosotros, Guille e Iris por acompañarme durante todos estos años, por crecer y evolucionar junto a mí, porque, aunque la vida pueda ser un lienzo en blanco, vosotros sois la brocha con la que puedo dibujar trazos duraderos.

A todos vosotros ¡Gracias!



Vida antes que muerte.

Fuerza antes que debilidad.

Viaje antes que destino.

*Brandon Sanderson, El camino de los reyes*



## Resumen

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado una metodología multidisciplinar para la evaluación del potencial fotoquímico y fotobiológico *in vitro* de los fármacos inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), combinando tanto estudios fotofísicos y de caracterización como estudios fotobiológicos en biomoléculas modelo y en cultivos celulares, concretamente en queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT). Así, el objetivo general es investigar si estos fármacos, en combinación con la radiación solar, son capaces de inducir reacciones de fotosensibilidad y, por tanto, poder alertar a los oncólogos de estos hallazgos para que puedan indicar pautas de fotoprotección adecuadas a sus pacientes, y así prevenir estos efectos indeseados. Esta tesis se divide en un total de 7 capítulos.

En el primero (introducción), se recogen los hitos más importantes relacionados con los inhibidores de la PARP, así como un resumen acerca de las reacciones de fotosensibilización y de los mecanismos químicos y biológicos involucrados en las mismas. Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica acerca de estos fármacos, se hizo un primer cribado de los cinco de la tercera y última generación (rucaparib, talazoparib, niraparib, olaparib y veliparib), identificando así tres de ellos como posibles agentes fotosensibilizantes: rucaparib, talazoparib y niraparib, cuyo estudio se describe en profundidad en los capítulos 4, 5 y 6 de la tesis.

En el capítulo 4 se evalúa la fototoxicidad del rucaparib (RCP), un fármaco que, a pesar de tener un cromóforo indol en su estructura química, posee un desplazamiento batocrómico hacia la región UVA de la luz solar, siendo así capaz de inducir reacciones de fotosensibilidad. Se observó mediante experimentos de fluorescencia y fotólisis de destello láser que, tras absorción de luz en esta región del espectro, tiene lugar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que podrían ser las responsables de generar un daño fotooxidativo hacia el ADN celular y a las proteínas transmembrana, originando como resultado una foto(geno)toxicidad. Además, se estableció que el mecanismo de la muerte celular fotoinducida por RCP es por apoptosis.

El capítulo 5 se centra en la evaluación del perfil de fotoseguridad de talazoparib (TLZ), el cual, tras su irradiación con luz UVA da lugar a un fotoproducto que, tras su aislamiento y caracterización, resultó no presentar fotorreactividad. Este fotoproducto resultó además ser el responsable de reducir significativamente el potencial fototóxico del fármaco original, ya que no se detectaron especies transitorias tras su irradiación con luz UVA. Además, para el TLZ se reveló la producción *in vitro* de ROS, especies que podrían ser las responsables de generar un daño fotooxidativo tanto hacia el ADN celular como a las proteínas de membrana, originando como resultado una foto(geno)toxicidad.

En el capítulo 6 se evalúa la fototoxicidad del niraparib (NRP) y su principal metabolito (N-M1). A pesar de que ambos compuestos resultaron ser fototóxicos, dicha fototoxicidad no afectó igual a las principales dianas celulares, ya que el daño fotooxidativo de NRP se observó en lípidos, en proteínas transmembrana y en el ADN celular, mientras que en N-M1 se aprecia fundamentalmente en las proteínas de membrana. Además, la toxicidad observada del NRP en células de cáncer de ovario (A2780 y A2780cis) indicó que este fármaco podría contemplarse como candidato para su uso en un futuro en la terapia fotodinámica para el tratamiento del cáncer de ovario.

Finalmente, con todo ello se concluye que estos fármacos de la familia de los inhibidores de la PARP (RCP, TLZ y NRP) son capaces de inducir reacciones de fotosensibilidad, con valores de factor de fotoirritación (PIF) de 41, 7 y 46, respectivamente. Cabe destacar que el TLZ es el fármaco que presenta el menor potencial fototóxico de los tres ensayados. Esto podría atribuirse a su rápida fotoconversión en un fotoproducto que resultó ser no fotorreactivo.

Por todo lo mencionado anteriormente, se pone de manifiesto la necesidad de conocer el potencial foto(geno)tóxico de estos fármacos, utilizados ampliamente para las terapias dirigidas contra el cáncer, con el fin de evitar posibles reacciones de fotosensibilidad, o al menos de minimizar sus efectos no deseados, recomendando pautas de fotoprotección adecuadas.

## Resum

En la present tesi doctoral s'ha desenvolupat una metodologia multidisciplinària per a l'avaluació del potencial fotoquímic i fotobiològic *in vitro* dels fàrmacs inhibidors de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), combinant tant estudis fotofísics i de caracterització com estudis fotobiològics en biomolècules model i en cultius cel·lulars, concretament en queratinòcits humans immortalitzats (HaCaT). Així, l'objectiu general és investigar si aquests fàrmacs, en combinació amb la radiació solar, són capaços d'induir reaccions de fotosensibilitat i, per tant, poder alertar als oncòlegs d'aquestes fites perquè puguin indicar pautes de fotoprotecció adequades als seus pacients, i així previndre aquests efectes no desitjats. Aquesta tesi es divideix en un total de 7 capítols.

En el primer (introducció), es recullen les fites més importants relacionades amb els inhibidors de la PARP, així com un resum sobre les reaccions de fotosensibilització i dels mecanismes químics i biològics involucrats en aquestes. Després d'una exhaustiva cerca bibliogràfica sobre aquests fàrmacs, es va fer un primer estudi dels cinc de la tercera i última generació (rucaparib, talazoparib, niraparib, olaparib i veliparib), identificant així tres d'ells com a possibles agents fotosensibilizants: rucaparib, talazoparib i niraparib, l'estudi del qual es descriu en profunditat en els capítols 4, 5 i 6 de la tesi.

En el capítol 4 s'avalua la fototoxicitat del rucaparib (RCP), un fàrmac que, malgrat tindre un cromòfor indole en la seua estructura química, posseeix un desplaçament batocròmic cap a la regió UVA de la llum solar, sent així capaç d'induir reaccions de fotosensibilitat. Mitjançant experiments de fluorescència i fotòlisi de flaix làser es va observar que, després de l'absorció de llum en aquesta regió de l'espectre, té lloc la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS), que podrien ser les responsables de generar un dany fotooxidatiu cap a l'ADN cel·lular i a les proteïnes transmembrana, originant com a resultat una foto(geno)toxicitat. A més, es va establir que el mecanisme de la mort cel·lular fotoinduïda per RCP és per apoptosi.

El capítol 5 se centra en l'avaluació del perfil de fotoseguretat de talazoparib (TLZ), el qual, després de la seua irradiació amb llum UVA dona lloc a un fotoproducte que, després del seu aïllament i caracterització, va resultar no presentar fotorreactivitat ninguna. Aquest fotoproducte va resultar a més ser el responsable de reduir significativament el potencial fototòxic del fàrmac original, ja que no es van detectar espècies transitòries després de la seua irradiació amb llum UVA. A més, per al TLZ es va revelar la producció *in vitro* de ROS, espècies que podrien ser les responsables de generar un dany fotooxidatiu tant cap a l'ADN cel·lular com a les proteïnes de membrana, originant com a resultat una foto(geno)toxicitat.

En el capítol 6 s'avalua la fototoxicitat del niraparib (\*NRP) i el seu principal metabòlit (N-M1). A pesar que tots dos compostos van resultar ser fototòxics, aquesta fototoxicitat no va afectar per igual a les principals dianes cel·lulars, ja que el dany fotooxidatiu de NRP es va observar en lípids, en proteïnes i en l'ADN cel·lular, mentre que en N-M1 s'aprecia fonamentalment en les proteïnes de membrana. A més, la toxicitat observada del NRP en cèl·lules de càncer d'ovari (A2780 i A2780cis) va indicar que aquest fàrmac podria contemplar-se com a candidat per al seu ús en un futur en la teràpia fotodinàmica per al tractament del càncer d'ovari.

Finalment, amb tot això es conclou que aquests fàrmacs de la família dels inhibidors de la PARP (RCP, TLZ i NRP) són capaços d'induir reaccions de fotosensibilitat, amb valors de factor de fotoirritació (PIF) de 41, 7 i 46, respectivament. Cal destacar que el TLZ és el fàrmac que presenta potencial fototòxic més menut dels tres assajats. Això podria atribuir-se a la seua ràpida fotoconversió en un fotoproducte que va resultar ser no fotorreactiu.

Per tot l'esmentat anteriorment, es posa de manifest la necessitat de conèixer el potencial foto(geno)tòxic d'aquests fàrmacs, utilitzats àmpliament per a les teràpies dirigides contra el càncer, amb la finalitat d'evitar possibles reaccions de fotosensibilitat, o almenys de minimitzar els seus efectes no desitjats, recomanant pautes de fotoprotecció adequades.

## Abstract

In this doctoral thesis, a multidisciplinary methodology has been performed for the evaluation of the *in vitro* photochemical and photobiological potential of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, combining photophysical and photobiological studies in biomolecules and cell cultures, specifically in human immortalized keratinocytes (HaCaT). Thus, the general objective is to investigate if these drugs, in combination with solar radiation, can trigger photosensitivity reactions; this will allow oncologists to indicate appropriate photoprotective guidelines to their patients in order to prevent these undesirable effects. This thesis is divided into 7 chapters.

The first one (introduction) contains the essential issues concerning PARP inhibitors, a background of the photosensitization reactions and a description of the involved chemical and biological mechanisms. After in-depth bibliographical research about these drugs, a screening of the five PARP inhibitors (rucaparib, talazoparib, niraparib, olaparib and veliparib) of the third and last generation was carried out, identifying three of them as possible photosensitizing drugs: rucaparib, talazoparib and niraparib. Their behaviour is thoroughly described in chapters 4, 5 and 6.

Chapter 4 evaluates the phototoxicity of rucaparib (RCP), a drug that possess an indole chromophore in its chemical structure but displays a bathochromic shift towards the UVA region of sunlight, which makes it able to induce photosensitivity reactions. Generation of reactive oxygen species (ROS) after UVA light absorption was detected by fluorescence and laser flash photolysis experiments. These species could generate photooxidative damage to cellular DNA and transmembrane proteins, resulting in photo(geno)toxicity. In addition, it was established that the mechanism of RCP photoinduced cell death is by apoptosis.

Chapter 5 focuses on the photosafety profile of talazoparib (TLZ), a compound that, after UVA irradiation, gives rise to a photooxidized product; after isolation and characterization, the photoproduct did not display any photoreactivity, and no transient species were detected after UVA light irradiation. Therefore, it was

responsible for the significantly reduced phototoxic potential of the parent drug. Additionally, for TLZ, *in vitro* ROS production was detected. These species could lead to photooxidative damage to both cellular DNA and membrane proteins, resulting in photo(geno)toxicity.

Chapter 6 deals with the phototoxicity of niraparib (NRP) and its main metabolite (N-M1). Although both compounds are phototoxic, the phototoxicity was found to be different for the main cellular targets: thus, the photooxidative damage of NRP was noticed in lipids, transmembrane proteins and cellular DNA, whereas in N-M1 it was mainly observed in membrane proteins. In addition, NRP was cytotoxic in ovarian cancer cells (A2780 and A2780cis), indicating that this drug could be considered as a future candidate for its use in photodynamic therapy to treat ovarian cancer.

Finally, it can be concluded that these PARP inhibitors (RCP, TLZ and NRP) are able to induce photosensitivity disorders, with PIF values of 41, 7 and 46, respectively. It is worth noting that TLZ has the lowest phototoxic potential of all three compounds tested. This could be attributed to a fast photoconversion towards a non-photoreactive photoproduct.

Taking into account these findings, there is a need of knowledge about the photo(geno)toxic potential of these drugs, which nowadays are widely used for targeted therapy against cancer; this will allow to avoid possible photosensitivity reactions or to minimize undesirable effects by recommending appropriate photoprotection guidelines.



## Abreviaturas y acrónimos

A	Absorbancia
A2780	Células de cáncer de ovario humanas
A2780cis	Células de cáncer de ovario humanas, variante cisplatino resistente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AL	Ácido linoleico
ASH	Albúmina sérica humana
BER	Reparación por escisión de bases (en inglés, <i>base excision repair</i> )
<i>BRCA 1/2</i>	Gen del cáncer de mama 1/2 (en inglés, <i>breast cancer</i> )
CD <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CH <sub>3</sub> CH	Acetonitrilo
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CPDs	Dímeros de timina ciclobutano
CPZ	Clorpromazina
δ	Desplazamiento químico
DCF	2'7'-diclorofluoresceína
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DSB	Roturas de cadena doble (en inglés, <i>double-strand break</i> )
E <sub>s</sub>	Energía del primer estado excitado singlete

$E_T$	Energía del primer estado excitado triplete
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser
$\phi_F$	Rendimiento cuántico de fluorescencia
$\phi_\Delta$	Rendimiento cuántico de oxígeno singlete
H <sub>2</sub> DCF-DA	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
HaCaT	Queratinocitos humanos inmortalizados
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
IC <sub>50</sub>	Concentración de un fármaco que genera una inhibición de un 50 % en un proceso biológico.
$J$	Constante de acoplamiento
$k_q$	Constante de desactivación
$k_F$	Constante de desactivación de fluorescencia
$\lambda$	longitud de onda
Milli-Q	Agua ultrapura
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difenil tetrazolio
MV <sup>2+</sup>	Metil viológeno
NER	Reparación por escisión de nucleótido (en inglés, <i>nuclear excision repair</i> )
NRP	Niraparib

NRU	Ensayo de captación de rojo neutro (en inglés, <i>neutral red uptake</i> )
N-M1	Metabolito M1 del niraparib
$^1\text{O}_2 / ^1\Delta_g$	Oxígeno singlete
5-OH DCF	5-hidroxiciclofenaco
P	Fosforescencia
PARP	Enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa
PARP-1/2	Isoformas 1/2 de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa
PARPi	Inhibidor de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino a pH = 7,4
PIF	Factor de fotoirritación (en inglés, <i>photoirritation factor</i> )
PS	Fotosensibilizador
RCP	Rucaparib
RH	Recombinación homóloga
RMN	Resonancia magnética y nuclear
RMN- $^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- $^{13}\text{C}$	Resonancia magnética nuclear de carbono
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSB	Roturas de cadena simple (en inglés, <i>single-strand break</i> )
SYBR® Gold	Marcador de ácidos nucleicos, colorante de cianina

SYBR® Safe	Marcador de ácidos nucleicos, colorante de tiazol.
TCA	Ácido tricloroacético
TLZ	Talazoparib
TLZ-P	Fotoproducto del talazoparib
$\tau_F$	Tiempo de vida de fluorescencia
$\tau_T$	Tiempo de vida de triplete
$\tau_\Delta$	Tiempo de vida del oxígeno singlete
u.a.	Unidades arbitrarias
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UV/Vis	Ultravioleta/visible

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1. Introducción</b> .....	<b>25</b>
1.1. El cáncer.....	27
1.2. Inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARPis).....	29
1.2.1. Función reparadora del ADN de la PARP-1.....	30
1.2.2. Desarrollo de inhibidores de la PARP (PARPis).....	33
1.2.3. Mecanismo de acción de los inhibidores PARP.....	37
1.3. Fotoquímica molecular.....	42
1.3.1. Procesos fotofísicos.....	43
1.3.2. Procesos fotoquímicos.....	48
1.3.3. Oxígeno singlete.....	49
1.4. Fotosensibilización.....	52
1.4.1. Daño fotosensibilizado a las biomoléculas.....	52
1.4.2. Reacciones cutáneas fotosensibilizadas.....	54
1.4.3. Fotosensibilidad inducida por fármacos.....	60
1.4.4. Fototoxicidad y fotoalergia.....	64
1.5. Mecanismo de muerte celular.....	68
1.6 Bibliografía.....	70
<b>Capítulo 2. Objetivos</b> .....	<b>79</b>
2.1. Hipótesis inicial.....	81
2.2. Objetivos.....	82
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos</b> .....	<b>85</b>
3.1. Reactivos.....	87
3.2. Sección experimental.....	87
3.2.1. Condiciones de cultivo celular.....	87
3.2.2. Medidas espectrofotométricas.....	88
3.2.3. Equipo de irradiación en estado estacionario.....	90
3.2.4. Medidas de resonancia magnética nuclear.....	91
3.2.5. Localización celular por microscopía confocal.....	91

3.2.6. Ensayo de fototoxicidad <i>in vitro</i> : captación de rojo neutro (NRU).....	92
3.2.7. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> MTT.....	93
3.2.8. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	94
3.2.9. Fotoperoxidación lipídica. ....	94
3.2.10. Fotooxidación de proteínas.....	98
3.2.11. Fotogenotoxicidad. ....	100
3.2.12. Mecanismos de muerte celular. ....	103
3.2.13. Análisis de datos y estadística. ....	105
3.3. Bibliografía. ....	106
<b>Capítulo 4. Rucaparib .....</b>	<b>109</b>
4.1. Introducción. ....	111
4.2. Sección experimental. ....	113
4.2.1. Irradiación en estado estacionario y aislamiento del fotoproducto. ...	113
4.2.2. Localización celular por microscopía confocal.....	114
4.2.3. Ensayo de fototoxicidad <i>in vitro</i> : captación de rojo neutro (NRU).....	114
4.2.4. Ensayo de fotoperoxidación lipídica. ....	114
4.2.5. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	114
4.2.6. Fotooxidación de proteínas.....	115
4.2.7. Daño fotoinducido al ADN: ensayo cometa. ....	115
4.2.8. Ensayo de activación de la caspasa-3/7. ....	115
4.2.9. Ensayo de detección de la enzima LDH.....	115
4.3 Resultados y discusión.....	116
4.3.1. Internalización celular de rucaparib.....	116
4.3.2. Fotólisis del rucaparib.....	117
4.3.3. Propiedades fotofísicas.....	122
4.3.4. Evaluación de la fototoxicidad <i>in vitro</i> inducida por rucaparib. ....	123
4.3.5. Mecanismo de muerte celular. ....	134
4.4. Conclusiones. ....	136
4.5. Bibliografía.....	137

<b>Capítulo 5. Talazoparib.....</b>	<b>141</b>
5.1. Introducción. ....	143
5.2. Sección experimental. ....	145
5.2.1. Fotólisis en estado estacionario y aislamiento del fotoproducto.....	145
5.2.2. Ensayo de fototoxicidad <i>in vitro</i> : captación de rojo neutro (NRU).....	146
5.2.3. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	146
5.2.4. Ensayo de fotooxidación de proteínas. ....	147
5.2.5. Ensayo cometa alcalino. ....	147
5.3 Resultados y discusión.....	148
5.3.1. Irradiación del talazoparib en medio acuoso. ....	148
5.3.2. Propiedades fotofísicas.....	153
5.3.3. Estudios de fototoxicidad <i>in vitro</i> .....	157
5.4. Conclusiones. ....	168
5.5. Bibliografía.....	169
<b>Capítulo 6. Niraparib.....</b>	<b>173</b>
6.1. Introducción. ....	175
6.2. Sección experimental. ....	177
6.2.1. Fotólisis en estado estacionario. ....	177
6.2.2. Ensayo de fototoxicidad <i>in vitro</i> : captación de rojo neutro (NRU).....	177
6.2.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT.....	178
6.2.4. Fotooxidación de proteínas.....	178
6.2.5. Daño fotosensibilizado al ADN plasmídico. ....	178
6.2.6. Ensayo cometa alcalino. ....	178
6.2.7. Fotoperoxidación lipídica. ....	179
6.3 Resultados y discusión.....	179
6.3.1. Estudios fotofísicos.....	179
6.3.2. Estudios de fototoxicidad celular <i>in vitro</i> .....	188
6.3.3. Fotooxidación de lípidos. ....	195
6.3.4. Fotooxidación de proteínas.....	197
6.3.5. Evaluación del daño fotoinducido al ADN.....	198
6.4. Conclusiones. ....	202

6.5. Bibliografía .....	204
<b>Capítulo 7. Conclusiones .....</b>	<b>207</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>213</b>



# CAPÍTULO 1

---

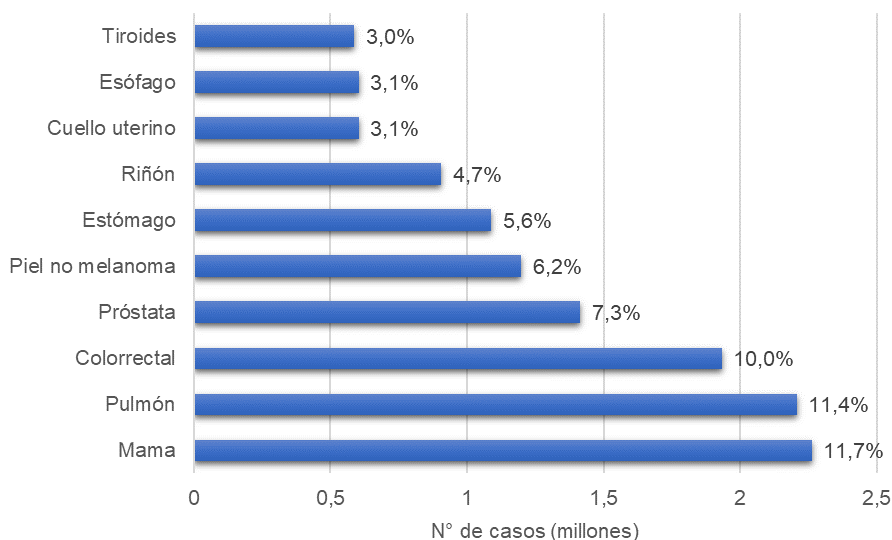
Introducción



## 1.1. El cáncer.

El cáncer engloba un grupo de enfermedades de origen genético caracterizadas por la aparición de células con un crecimiento masivo y descontrolado, que originan una masa anormal de tejido denominado tumor o neoplasia que puede diseminarse a otras partes del cuerpo. Su acumulación sistemática provoca el deterioro de las funciones básicas del organismo, hasta que finalmente pueden provocar la muerte del individuo<sup>1, 2</sup>.

En la actualidad, este grupo de enfermedades es una de las diez principales causas de muerte en el mundo, donde se estima que, de acuerdo con el Observatorio Global del Cáncer (*Global Cancer Observatory*, GLOBOCAN), en 2020 se diagnosticaron aproximadamente 19 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y alrededor de 10 millones de defunciones estuvieron relacionadas con este grupo de enfermedades, donde el cáncer de mama fue el que presentó más casos a nivel mundial, seguido del cáncer de pulmón y colorrectal (Figura 1)<sup>3, 4</sup>.



**Figura 1.** Estimación mundial del número de nuevos casos de los cánceres con mayor incidencia en 2020. Figura adaptada de la referencia 3.

A pesar de que el concepto de cáncer o carcinoma surgió en el año 400 a.C. por Hipócrates, el considerado padre de la medicina, no fue hasta el siglo XIX cuando se comenzaron a ver avances significativos en la detección y el tratamiento contra este grupo de enfermedades como, por ejemplo:

- El descubrimiento de los rayos X en 1895 por Wilhelm Conrad Röntger, que facilitó la detección tumoral no invasiva.
- El estudio publicado en 1946 por Louis Goodman y Alfred Gilman sobre el uso de mostazas nitrogenadas como potenciales agentes quimioterapéuticos, lo que perfeccionó el proceso diagnóstico y terapéutico de esta enfermedad.
- El hallazgo por Michael Bishop y Harold Varmus en 1976 de que los oncogenes (genes anormales responsables de la transformación de una célula normal en una maligna) provenían a partir de la alteración de genes propios que regulan el crecimiento celular, los denominados protooncogenes.

A partir de entonces, la mejora de las herramientas tecnológicas disponibles permitió el desarrollo de biomarcadores predictivos, proporcionando la clave hacia el desarrollo de técnicas de detección precoz del cáncer, e impulsando el avance hacia nuevos tratamientos presentes en la actualidad, como la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, la cirugía mínimamente invasiva y la terapia fotodinámica (*photodynamic therapy*, PDT)<sup>5</sup>.

Estos avances han sido claves para el desarrollo de una amplia variedad de tratamientos contra el cáncer. En este contexto, las terapias dirigidas contra el cáncer se basan en un enfoque terapéutico que utiliza fármacos que actúan contra dianas específicas involucradas en el crecimiento, avance y diseminación del cáncer, provocando un efecto citostático y/o citotóxico en las células tumorales.

En este sentido, los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARPi) son un claro ejemplo de ello, ya que este grupo farmacológico ejerce una letalidad sintética en aquellas células cancerosas con mutaciones germinales o somáticas en los

genes *BRCA1/2* al bloquear la reparación del ADN celular por acción de la enzima PARP. No obstante, el uso recurrente de fármacos conlleva la aparición de efectos secundarios, entre las que se encuentran las reacciones de fotosensibilidad generadas por la activación de la luz solar del fármaco, que puede ser capaz de desencadenar una cascada de eventos químicos que, finalmente, originen una serie de reacciones adversas, tales como la fototoxicidad, la fotoalergia y la fotocarcinogénesis.

## **1.2. Inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARPi).**

El mecanismo de acción principal de los PARPi está estrechamente relacionado con la inhibición de la actividad catalítica de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP-1), la cual posee un papel fundamental en los procesos de detección, señalización y reparación del ADN dañado. Concretamente, actúan en aquellos procesos que producen una rotura o discontinuidad en una de las hebras del ADN (proceso conocido como roturas de cadena simple o *single-strand breaks*, SSBs). Estas roturas son generadas por diversos factores exógenos y endógenos, tales como: errores de replicación, radiación ionizante, especies reactivas de oxígeno (ROS) y sitios abásicos (también conocidos como sitiosapurínicos/apirimidínicos o sitios AP)<sup>6</sup>.

Si bien es cierto que esta enzima también está involucrada en la reparación de roturas originadas en ambas hebras (roturas de cadena doble o *double-strand breaks*, DSBs), la actividad enzimática de PARP-1 es clave para activar los principales mecanismos de reparación de SSBs, especialmente la reparación por escisión de bases (*base excision repair*, BER), reparación por escisión de nucleótidos (*nuclear base excision*, NER) o reparación de mellas de ADN monocatenario (*single-stranded DNA nicks*).

### 1.2.1. Función reparadora del ADN de la PARP-1.

La PARP-1 es una enzima nuclear multifuncional altamente conservada por todos los organismos eucariotas cuya estructura ha sido ampliamente caracterizada y consta de tres dominios estructurales<sup>7, 8</sup>:

- Dominio de unión al ADN localizado en el extremo *N*-terminal en el que se localizan estructuras en dedos de cinc que le permiten reconocer e interactuar con estructuras del ADN (entre las que se encuentran roturas de cadena simple o SSB).
- Dominio de automodificación que contiene residuos de glutamina, aspartato y lisina que permite la reacción de poli ADP-ribosilación o PARilación *in situ*.
- Dominio catalítico localizado en el extremo C-terminal con dos subdominios: un subdominio WGR que participa en el reconocimiento de DSB y un subdominio ATR ((ADP-ribosil) transferasa) que contiene la secuencia de la “firma” PARP, responsable de la reacción de PARilación.

Cabe destacar que, aunque la familia de las proteínas PARP abarca un total de 18 proteínas con una secuencia “firma PARP” común, PARP-1 es la proteína más importante de la familia al estar implicada en múltiples funciones celulares como el mantenimiento de la integridad genómica, la regulación de la expresión genética, la regulación del ciclo celular entre otros, pero la más importante de todas ellas es la señalización y reparación del ADN dañado, función compartida con la proteína PARP-2<sup>9, 10</sup>.

Ante la inducción de diversos tipos de daño al ADN, PARP-1 es capaz de detectar el ADN dañado gracias a su dominio de unión al ADN y es rápidamente reclutado hacia él, lo que estimula su actividad catalítica e inicia la síntesis de cadenas de poli ADP-ribosa (reacción de poli (ADP-ribosilación) o PARilación)<sup>8, 9</sup>, una reacción bioquímica que consta de tres pasos bien diferenciados:

1. **Iniciación.** La actividad catalítica de PARP-1 comienza escindiendo el enlace glicosídico entre la nicotinamida (NAM) y la ribosa del sustrato nicotina adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>), liberando monómeros de ADP-ribosa y consumiendo ATP en el proceso. Posteriormente, la ADP-ribosa se une covalentemente a residuos de glutamina, aspartato o lisina de proteínas aceptoras mediante un proceso de transesterificación. Estas proteínas aceptoras pueden ser proteínas histonas o la propia PARP-1.
2. **Elongación y ramificación.** La actividad poli (ADP-transferasa) de PARP-1 permitirá la formación y crecimiento de la cadena de poli (ADP-ribosa) (cadena PAR), empleando unidades de ADP-ribosa obtenidas del paso anterior. Los monómeros de ADP-ribosa se unen entre sí mediante enlaces ribosa-ribosa 1',2"-O-glicosídicos, generando cadenas lineales de poli (ADP-ribosa) de unas 200 unidades de ADP-ribosa, con ramificaciones cada 20-50 unidades<sup>11</sup>.
3. **Reclutamiento.** Las proteínas encargadas de iniciar el mecanismo de reparación del ADN se unen a las cadenas de PAR mediante interacciones covalentes o no covalentes, permitiendo su reclutamiento en el lugar donde se ha producido el daño. Las proteínas reclutadas dependerán del tipo de daño al ADN ejercido, así como del mecanismo llevado a cabo para la correcta reparación<sup>12, 13</sup>.

A medida que avanza la autoPARilación, la formación de las cadenas de PAR aumenta la actividad de PARP-1 hasta que finalice la etapa de señalización del daño, momento en el cual la acumulación de cargas negativas induce una disminución de la afinidad de PARP-1 por el ADN y su actividad enzimática decae, liberándose del sitio de unión y permitiendo la degradación de las cadenas de PAR, completándose así el ciclo del NAD<sup>+</sup> y dejando a PARP-1 de nuevo activa para un nuevo ciclo de PARilación.

El catabolismo de las cadenas de PAR está regulado principalmente por la enzima poli (ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG), una enzima con gran afinidad por estas

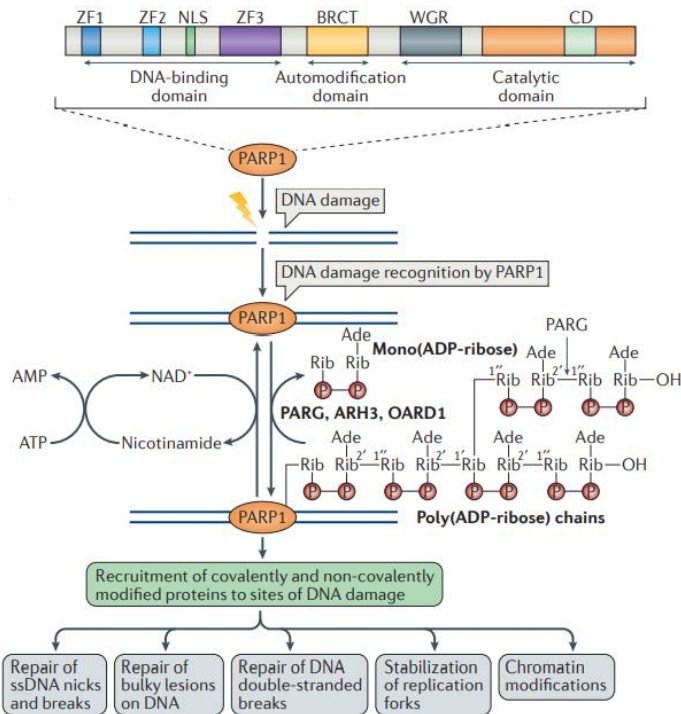
cadena que posee actividad tanto endo- como exo-glicohidrolasa, y cuya función es hidrolizar los enlaces ribosa-ribosa 1',2"-O-glicosídicos entre las unidades de ADP-ribosa que conforman las cadenas de PAR<sup>14</sup>. Esta enzima es crucial para el mantenimiento, la regulación y el reciclado de estas cadenas, así como el mantenimiento de la actividad enzimática de PARP-1 ya que, en caso contrario, la ausencia o mal funcionamiento de esta enzima está relacionado con el deterioro del crecimiento celular y la muerte celular inducida por apoptosis<sup>15</sup>.

Complementaria a la enzima PARG, en la degradación de las cadenas de PAR también interviene la enzima ADP-ribosil hidrolasa-3 (ARH3), una enzima cuya función es similar a la PARG al hidrolizar estas cadenas<sup>16</sup>, y la enzima O-acil-ADP-ribosa desacilasa 1 (OARD1, también conocida como TARG1), encargada de escindir el enlace éster entre el monómero ADP-ribosa terminal y la proteína aceptora modificada<sup>17</sup>.

Una vez degradada la cadena de PAR y liberados todos los monómeros de ADP-ribosa, el ciclo del NAD<sup>+</sup> se completa con la reacción de las unidades de ADP-ribosa con la nicotinamida, catalizada por la enzima ADP-ribosa pirofosfatasa, para obtener NAD<sup>+</sup> y consumiendo ATP en el proceso<sup>18</sup>.

Un esquema del mecanismo de reparación del ADN desempeñado por la enzima PARP-1 se muestra en la Figura 2.





**Figura 2.** Funciones de la enzima poli (ADP-ribose) polimerasa 1 (PARP-1) en la reparación del daño al ADN. Figura tomada de la referencia 9.

### 1.2.2. Desarrollo de inhibidores de la PARP (PARPi).

El desarrollo de los PARPi se remonta al año 1963, cuando se reportó por primera vez la actividad de la PARP y las principales enzimas involucradas en dicha actividad<sup>19</sup>, lo que despertó un gran interés en desarrollar moléculas que pudiesen inhibir dicha actividad con el fin de comprender mejor su funcionalidad. Como se ha detallado en el apartado anterior, la gran mayoría de los compuestos capaces de inhibir la actividad de la PARP se basan en la unión específica al dominio catalítico de estas proteínas, produciendo una inhibición competitiva con el compuesto  $\text{NAD}^+$ , sustrato requerido para iniciar la actividad de PARP.

La primera generación de inhibidores de PARP se diseñaron en base a la estructura química de la nicotinamida, subproducto generado por la escisión de  $\text{NAD}^+$

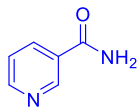
catalizada por estas enzimas, debido a que actuaba como inhibidor endógeno al ejercer una débil retroalimentación sobre la PARilación<sup>20</sup>. Dentro de esta generación destacaron la benzamida y la 3-aminobenzamida (Figura 3), un derivado de la benzamida que fue altamente estudiado y utilizado en su época debido a la mejora que ofrecía en la inhibición de la PARP gracias a la presencia del grupo arilamida, aunque su mecanismo de actuación todavía era desconocido<sup>21</sup>.

Sin embargo, a pesar de que estos compuestos resultaron eficaces sensibilizando a las células tumorales frente a la radio y quimioterapia, resultaron ser poco específicos sobre las PARPs, provocando la aparición de efectos secundarios que afectaban a la viabilidad celular, al metabolismo de la glucosa y a la síntesis del ADN, lo que los volvía altamente tóxicos<sup>22</sup>.

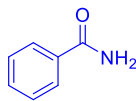
El interés en desarrollar nuevos inhibidores con una mayor especificidad y una menor toxicidad fue lo que propició la aparición de la segunda generación de inhibidores en la década de los 90, la cual fue posible gracias al conocimiento sobre la estructura de la PARP-1 y su interacción con el ADN<sup>23</sup>. La mayor contribución en el desarrollo de la estructura química del farmacóforo fue realizada por el grupo de investigación liderado por Banasik y Ueda, el cual desarrolló más de 100 compuestos como potenciales fármacos inhibidores de la PARP, descubriendo que las arilamidas policíclicas poseían un gran poder inhibitorio a escala micromolar. La optimización de estas estructuras permitió el desarrollo de nuevas estructuras farmacológicas derivadas de lactamas cíclicas, como las isoquinolonas, dihidroisoquinolonas, quinazolininas, fenantrididonas y ftalazinas<sup>24</sup> (Figura 3).

Al poco tiempo, inspirados en las prometedoras arilamidas policíclicas, el grupo de Golden y Griffin diseñó estructuras pseudocíclicas, como los benzoxazoles carboxamidas y los bencimidazoles carboxamidas<sup>25</sup>. La clave de estas estructuras es la formación de un pseudoanillo que restringe la rotación del grupo amida a través de un puente de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno de la carboxamida y el nitrógeno del imidazol<sup>26</sup> (Figura 3).

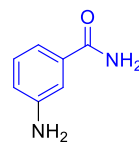
## 1ª generación



Nicotinamida  
IC<sub>50</sub> = 210 μM

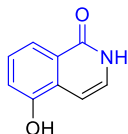


Benzamida  
IC<sub>50</sub> = 22 μM



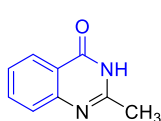
3-aminobenzamida  
IC<sub>50</sub> = 33 μM

## 2ª generación



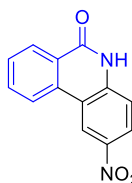
5-hidroxisoquinol-  
1(2H)-ona

IC<sub>50</sub> = 0,39 μM



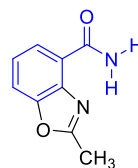
2-metilquinazolin-  
4(3H)-ona

IC<sub>50</sub> = 5,6 μM



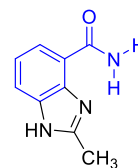
2-nitrofenantridin-  
6-(5H)-ona

IC<sub>50</sub> = 0,39 μM



2-metilbenzoxazol-  
4-carboxamida

IC<sub>50</sub> = 9,5 μM



2-metil-1H-  
benzimidazol-  
4-carboxamida

IC<sub>50</sub> = 1,1 μM

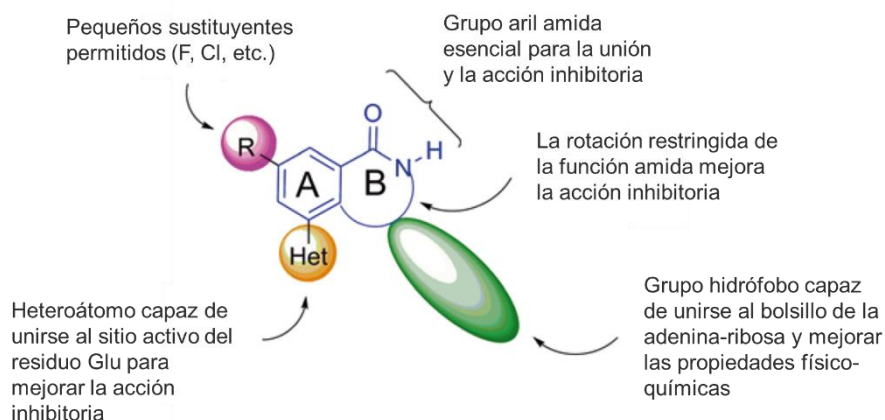
**Figura 3.** Estructura de los inhibidores PARP más representativos de la 1ª y 2ª generación. Los valores de IC<sub>50</sub> hacen referencia a la concentración inhibitoria del compuesto que genera una reducción del 50 % en la actividad de la enzima PARP-1.

Con la resolución por difracción de rayos X de la estructura de algunos complejos formados en el dominio catalítico de la PARP con inhibidores de primera generación, <sup>27, 28</sup> muchos de los aspectos del farmacóforo pudieron ser explicados en base a las interacciones con el sitio de unión.

Fue a partir de entonces cuando se establecieron los criterios de diseño que debía incluir cualquier grupo farmacóforo inhibidor de la PARP<sup>29-31</sup> (Figura 4):

1. Un sistema aromático o heterocíclico bicíclico o pseudobicíclico portador de una función carboxamida con rotación restringida. Este sistema permite que la función amida forme puentes de hidrógeno con los residuos Ser-904 y Gly-863 de la PARP-1. Cualquier interrupción en esta red causaría una pérdida de potencia inhibitoria.

2. Un heteroátomo en posición *meta* con respecto a la carboxamida, cuya función es formar puentes de hidrógeno con el residuo Glu-988 para mejorar la potencia inhibitoria.
3. Un pequeño sustituyente hidrófobo en el anillo aromático adyacente a la amida, que le permita encajar en el bolsillo del subsitio de unión de la nicotinamida rodeado por Ala-898 y Lys-903.
4. Un voluminoso grupo hidrofóbico adyacente al farmacóforo, que le permite llenar el gran bolsillo hidrofóbico adyacente al sitio de unión de la nicotinamida. Este bolsillo, también es conocido como el sitio de unión de la adenina-ribosa, es aprovechado para mejorar las propiedades farmacéuticas de los PARPis.

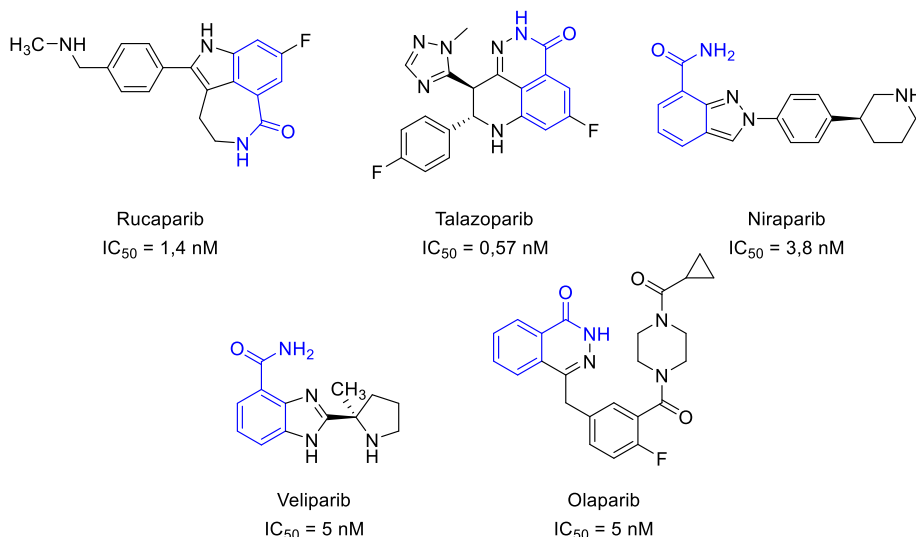


**Figura 4.** Grupo farmacóforo de los inhibidores de la PARP. Figura adaptada de la referencia 31.

El desarrollo de todos estos avances permitió desarrollar una tercera generación de inhibidores que destacan por ser compuestos extremadamente específicos, selectivos y con gran capacidad inhibitoria del rango nanomolar, tales como tricíclicos derivados de lactonas, indoles y bencimidazoles<sup>32</sup>.

Actualmente, de entre todos los inhibidores desarrollados en la última década, existen un total de cuatro inhibidores de la PARP aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en el tratamiento o mantenimiento contra diferentes tipos de cánceres que son: olaparib (OLP), rucaparib (RCP), niraparib (NRP) y talazoparib (TLZ). El quinto miembro de esta familia, veliparib (VLP), todavía se encuentra en fase clínica de estudio<sup>33</sup> (Figura 5).

### 3ª generación



**Figura 5.** Estructura de los inhibidores de la PARP de tercera generación. Los valores de  $IC_{50}$  hacen referencia a la concentración inhibitoria del compuesto que genera una reducción del 50 % en la actividad de la enzima PARP-1.

### 1.2.3. Mecanismo de acción de los inhibidores PARP.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la actividad enzimática de la PARP-1 resulta crucial en la reparación del daño al ADN para mantener la estabilidad genómica celular, ya que su reparación ineficiente induce una acumulación excesiva de ADN dañado. Esto provocaría la apoptosis celular con el objetivo de evitar la proliferación del daño no reparado, previniendo así la progresión de mutaciones genómicas y el desarrollo de carcinogénesis. Sin embargo, en aquellos casos donde

la capacidad celular de inducir apoptosis se vea reducida o comprometida, el daño no reparado conduce a una inestabilidad genómica característica de la progresión del cáncer<sup>34</sup>.

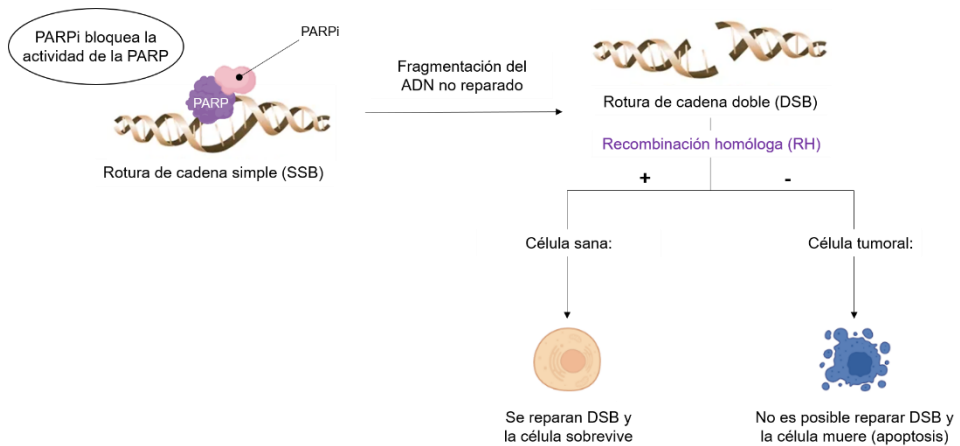
En este contexto, dado que la PARP-1 se activa en respuesta a daños en el ADN, especialmente los generados por acción de radiaciones ionizantes, agentes alquilantes y radicales libres, se despertó un gran interés por los PARPi como potentes agentes antineoplásicos, combinando así la inhibición de las PARPs con el uso de agentes quimioterapéuticos o radioterapia. Estos compuestos compiten con el sustrato NAD<sup>+</sup> por el dominio catalítico de la PARP-1, inhibiendo por un lado la reacción de la PARilación y, por otro lado, atrapando la proteína inactivada en el ADN, bloqueando así las horquillas de replicación y conduciendo a su colapso y la generación de DSBs<sup>35, 36</sup>. Este tipo de roturas se consideran las más citotóxicas, motivo por el cual han de ser reparadas con rapidez, ya que, si no se reparan, pueden causar grandes alteraciones cromosómicas (como reordenamientos, deleciones o translocaciones), o desencadenar la muerte celular por apoptosis.

Generadas las DSBs, la supervivencia celular dependerá de los sistemas de reparación de cadena doble, como la recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*, NHEJ)<sup>9</sup>, donde la acción de las proteínas BRCA1 y BRCA2 (*breast cancer*) codificadas por los genes *BRCA1/2* son claves para la reparación de los DSBs mediante la recombinación homóloga, ya que es la vía de reparación de DSBs más eficiente<sup>37</sup>.

Las mutaciones en los genes *BRCA1/2* están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar algunos tipos de cánceres. Sin embargo, la supervivencia de estas células tumorales se vuelve tremendamente dependiente de la actividad de la PARP-1 para mantener la integridad del genoma mediante la reparación de SSBs, ya que la deficiencia en los genes *BRCA1/2* impide reparar eficientemente las DSBs por RH. La acción inhibitoria de los PARPi en aquellas células deficientes en *BRCA1/2* conduce a que las SSBs en el ADN que no pueden ser reparadas progresen hacia DSBs, que tampoco pueden ser reparadas, e inciten un incremento

en la inestabilidad genómica hasta provocar finalmente la muerte celular<sup>8, 37</sup> (Figura 6). Este hecho hace que el uso de los PARPis sobre las células con deficiencia o mutación en los genes *BRCA1/2* de lugar a un fenómeno conocido como letalidad sintética, definido como la muerte celular provocada por la acción simultánea de varios factores que no serían letales de forma aislada<sup>8, 38, 39</sup>.

Aunque las DSBs todavía pueden repararse por la ruta NHEJ, esta vía de reparación es propensa a inducir errores sistemáticos, lo que conduce finalmente a la destrucción de la célula<sup>34, 37</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo de acción de los inhibidores de la PARP.

Sin embargo, a pesar de la gran eficacia de estos fármacos, el uso recurrente de los inhibidores de la PARP ha generado el desarrollo de mecanismos de resistencia frente a estos fármacos, reduciendo su efectividad e incluso, llegando a anular su acción terapéutica.

A día de hoy, se han descrito un gran número de casos clínicos donde la resistencia a la inhibición de los PARPs desarrollada por las células cancerosas plantea un reto para el tratamiento eficaz del cáncer. El estudio de los mecanismos de la resistencia de los inhibidores de la PARP no solo ayudará a proponer estrategias alternativas para mejorar los resultados de los pacientes, sino que también proporcionará las bases para la prevención de esta resistencia.

Aunque estos mecanismos están condicionados por múltiples factores que todavía son objeto de estudio, existen diversas formas de lograr el mismo resultado en cada uno de ellos<sup>33, 40</sup>. Los principales mecanismos de resistencia frente a la acción inhibitoria de los PARPis se recopilan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Principales mecanismos de resistencia a la acción inhibitoria de los PARPis.

Vía	Mecanismo
Restauración HR	Reactivación de proteínas clave Supresión NHEJ
Protección horquilla de replicación	Inhibición de nucleasas
Otros	Pérdida de actividad PARP Alteración del eflujo de fármacos

Una de las principales vías del desarrollo de la resistencia a los PARPi es la reversión de la letalidad sintética mediante la reactivación de proteínas clave involucradas en la RH en células cancerosas tratadas con inhibidores PARP. Este mecanismo se puede desarrollar a través de:

- Reversión genética: mutaciones secundarias en los genes involucrados en la RH (*BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* Y *RAD51D*) que restauran las funciones de dichos genes<sup>41, 42</sup>.
- Desmetilación del grupo promotor de *BRCA1*, el cual permite la reexpresión de este gen<sup>43</sup>.
- Reorganización del material genético de los genes implicados en la RH mediante fusión genética<sup>44</sup>.

Otro mecanismo de restauración de la RH es el debido a la supresión de NHEJ, la vía alternativa a la RH en la reparación de roturas de cadena doble, donde la proteína 53BP1 es la encargada de la activación de la ruta de reparación por NHEJ.



Se ha observado que la pérdida de expresión de esta proteína restaura la actividad de RH en células con mutaciones en el gen *BRCA1*<sup>40, 45-47</sup>.

Por otro lado, la estabilización de las horquillas de replicación mediante la inhibición de la actividad nucleasa es otra vía de desarrollo de resistencia a los PARPis. La nucleasa MRE11 es la principal responsable de este mecanismo, ya que se encarga de la degradación del ADN en las horquillas de replicación estancadas, evitando pérdida de material genético e inestabilidad del genoma. Los estudios realizados señalan que la inhibición de esta nucleasa consigue proteger las horquillas de replicación, permitiendo a las células cancerosas sobrevivir<sup>48, 49</sup>.

Adicionalmente, existen otros mecanismos que provocan la resistencia de las células tumorales hacia la inhibición de la PARP, tales como la propia alteración en la expresión de las enzimas PARP y la regulación de los genes de eflujo de fármacos. La acción inhibitoria de los PARPis provoca la inmovilización de PARP-1 en el lugar del ADN dañado, lo que conduce a un colapso en las horquillas de replicación del ADN y su posterior fragmentación, La pérdida de la actividad de PARP-1 reduce la formación del complejo PARP-1-ADN, el cual resulta ser más citotóxico que las propias roturas de cadena simple<sup>50</sup>, lo que se traduce en un aumento de la viabilidad celular y, por tanto, en un mecanismo de resistencia hacia la inhibición de los PARP<sup>51</sup>. Por otra parte, la sobreexpresión de transportadores ABC que codifican la bomba de eflujo de la glicoproteína P (una proteína transportadora encargada de regular el intercambio de sustancias a través de la membrana celular) favorece la expulsión de los PARPis del medio intracelular, reduciendo así su eficacia<sup>52, 53</sup>.

### 1.3. Fotoquímica molecular.

La fotoquímica molecular es una rama de la ciencia que estudia los procesos físicos y químicos provocados por la absorción de fotones y propone mecanismos de reacción basados en las estructuras moleculares.

Los procesos fotoquímicos suceden tras la absorción de la radiación UV/visible (200 – 800 nm). Esta absorción, producida por la generación de perturbaciones debido a la interacción entre el campo eléctrico de la molécula y del fotón, conduce a la absorción del fotón que transfiere su energía a la molécula, lo que induce un cambio en su configuración electrónica. Esta energía no se distribuye aleatoriamente en la molécula, sino que es absorbida selectivamente por grupos cromóforos (grupos insaturados con electrones en orbitales  $n$  o  $\pi$  que pueden absorber energía y excitarse a diferentes longitudes de onda como, por ejemplo, dienos, grupos carbonilo, anillos aromáticos, etc.). El estudio y la cuantificación de la distribución de la energía absorbida mediante espectroscopía de absorción y emisión molecular proporciona información sobre la estructura, energía y dinámica de los estados electrónicos excitados, facilitando la comprensión e interpretación de las propiedades fotofísicas y de la reactividad fotoquímica de los compuestos.

Cuando una molécula absorbe un fotón, alcanza un estado excitado electrónicamente inestable respecto al estado inicial o fundamental. En este punto, para liberar ese exceso de energía y regresar a su estado fundamental, la molécula excitada puede tomar diversos caminos a través de diferentes mecanismos que, en función del resultado final, se pueden clasificar en dos grandes grupos: procesos fotofísicos y fotoquímicos<sup>54, 55</sup>.

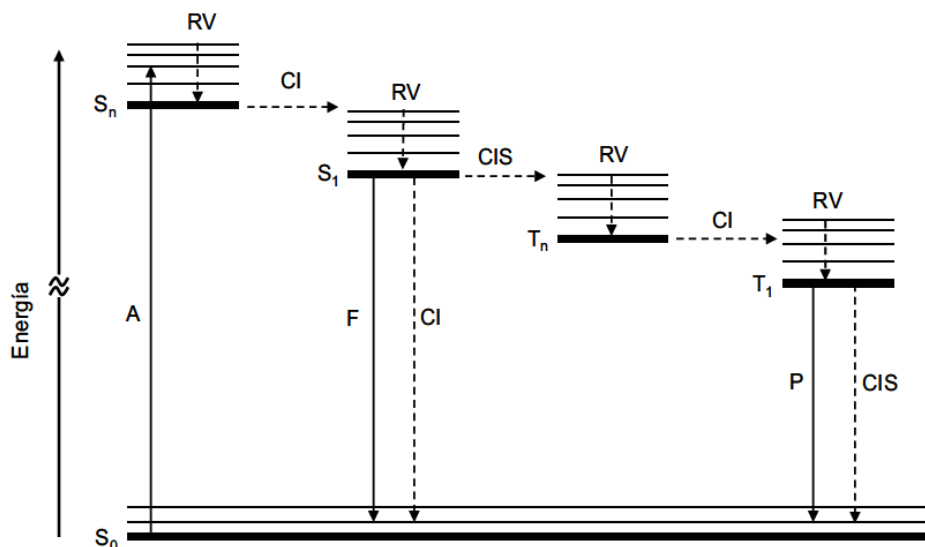
- Los procesos fotofísicos son aquellos que producen cambios en los estados cuánticos de las moléculas con el fin de alcanzar estados energéticos más estables sin que su estructura química se vea alterada. Son transiciones energéticas en las que se producen interconversiones entre estados excitados o entre un estado excitado y el fundamental.

- Los procesos fotoquímicos son las transformaciones químicas que puede experimentar una molécula desde su estado electrónico excitado para dar lugar a productos más estables con una estructura química diferente a la de partida.

### 1.3.1. Procesos fotofísicos.

Estos procesos, producidos por cambios cuánticos en las moléculas excitadas sin alterar su estructura química, se pueden clasificar en dos grupos: las transiciones radiantes, que implican un cambio en la energía total de la molécula debido a la absorción o emisión de un fotón, y las transiciones no radiantes, que implican conversiones entre estados energéticos de la molécula sin producirse ninguna emisión de radiación electromagnética. El diagrama de Jablonski (Figura 7) es una representación esquemática de las transiciones energéticas entre los distintos estados electrónicos de una molécula, donde los estados energéticos se agrupan verticalmente de acuerdo a su energía y horizontalmente en función de la multiplicidad de espín. Al mismo tiempo, las transiciones radiantes se indican mediante flechas continuas, mientras que las no radiantes por flechas discontinuas.

Además, cuando un electrón de la molécula es excitado a un nivel de energía superior, éste puede seguir apareado con el electrón del estado fundamental (números de espines opuestos), formándose un estado singlete excitado ( $S_n$ ), o puede cambiar su multiplicidad, desapareándose del mismo y originando un estado triplete excitado ( $T_n$ ).



**Figura 7.** Diagrama de Jablonsky modificado. Figura adaptada de la referencia 55.

Los procesos radiantes más comunes son la absorción, fluorescencia y fosforescencia,<sup>55, 56</sup> los cuales se describen a continuación:

### Absorción (A)

Es el fenómeno en el que una molécula absorbe la energía de un fotón y es promovida a un estado energético superior al inicial (estado excitado). La absorción está asociada a transiciones electrónicas entre diferentes niveles energéticos dentro de la molécula, las cuales pueden ser transiciones permitidas (singlete-singlete,  $S_0 + h\nu \rightarrow S_n$ ) o prohibidas (singlete-triplete,  $S_0 + h\nu \rightarrow T_n$ ) por la regla del espín.

Cuando un haz de luz monocromática atraviesa una muestra, la potencia del haz se ve atenuada por la absorción de fotones por parte de las moléculas absorbentes de la muestra. Se define entonces una propiedad de las sustancias denominada absorbancia, que es la relación logarítmica entre la intensidad del haz antes y después de atravesar la muestra. La ley de Lambert – Beer es la relación empírica entre la absorbancia de la muestra y su concentración, a través de la expresión:

$$A = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades del haz de luz monocromático antes y después de atravesar la muestra, respectivamente,  $l$  la distancia recorrida por la luz en el medio (cm),  $c$  la concentración de la sustancia en el medio (mol/L) y  $\varepsilon$  el coeficiente de absorción molar, que depende de la naturaleza de la sustancia, la longitud de onda del haz y la temperatura. Esta relación lineal entre absorbancia y concentración solamente es válida para valores de absorbancia bajos, ya que a valores altos se pierde esta linealidad y la absorbancia sigue un crecimiento asintótico.

Por otro lado, si se registra la diferencia de intensidad antes y después de atravesar la muestra con haces de luz de diferentes longitudes de onda en la región UV/vis (de menor a mayor energía), se obtiene el espectro de absorción de la muestra, un espectro cuyas bandas proporcionan información sobre los diferentes subniveles energéticos del mismo nivel energético del compuesto. A pesar de que no proporciona una clara identificación del compuesto, es útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula como, por ejemplo, las formas ácido-base de la misma sustancia.

### *Fluorescencia (F)*

Es el fenómeno de interacción entre la radiación y la materia en el que una molécula, previamente excitada, emite un fotón desde el estado excitado singlete de menor energía ( $S_1$ ) hasta el estado fundamental ( $S_0$ ) ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ , regla de Kasha). Al tratarse de una transición entre estados con la misma multiplicidad de spin, está permitida por la regla del spin.

Esta energía emitida es siempre menor que la absorbida, debido a los procesos de disipación interna de la molécula, ya que cuando una molécula absorbe radiación electromagnética, es promovida a un estado energético singlete de mayor energía ( $S_n$ ) que se mantiene durante un corto periodo de tiempo (Tabla 2), en el cual, la

molécula sufre cambios conformacionales e interacciones con el entorno, disipándose parcialmente esa energía hasta alcanzar el estado excitado singlete de menor energía ( $S_1$ ), momento en cual se producirá la emisión de la cantidad de energía restante para alcanzar el estado fundamental. La diferencia de energía entre los máximos de los espectros de absorción y de fluorescencia es conocida como desplazamiento de Stokes.

La emisión de fluorescencia se produce rápidamente (Tabla 2) y para disoluciones diluidas, está directamente relacionada con una constante la velocidad de fluorescencia  $k_F$ . En disoluciones concentradas se puede producir el “efecto filtro”, lo que hace que la intensidad de luz de excitación no sea constante a través de la disolución, provocando una pérdida en la linealidad de la emisión del compuesto.

Todos los compuestos capaces de emitir fluorescencia se denominan fluorocromos y contienen estructuras con configuraciones moleculares particulares, como grupos funcionales aromáticos o dobles enlaces conjugados. La parte del fluorocromo responsable de la emisión de fluorescencia se denomina fluoróforo. Normalmente, los compuestos capaces de emitir fluorescencia lo hacen en el rango de nanosegundos, aunque en algunos este proceso puede llegar a ser incluso más rápido, del orden de pico o femtosegundos.

La fluorescencia de un compuesto viene determinada por una serie de factores, como por ejemplo, el tipo de transición electrónica ( $n\pi^*$  o  $\pi\pi^*$ ), la estructura molecular, la naturaleza del disolvente empleado, la concentración, la temperatura, el pH, la cantidad oxígeno disuelto, etc<sup>57, 58</sup>.

Para caracterizar este fenómeno, se puede registrar el espectro de fluorescencia, en el que aparecen los máximos de emisión y que, por comparación con un patrón, permite determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_F$ ), así como el tiempo de fluorescencia ( $\tau_F$ ), que es el tiempo que tarda un fluoróforo que se encuentra en el estado excitado de emitir un fotón y regresar al estado fundamental.

### *Fosforescencia (P)*

Es el fenómeno de interacción entre la radiación y la materia en el que una molécula, previamente excitada, emite un fotón desde el estado excitado triplete de menor energía ( $T_1$ ) hasta el estado fundamental ( $S_0$ ) ( $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ , regla de Kasha). Al tratarse de una transición entre estados con diferente multiplicidad de spin, está prohibida por la regla del spin, es decir, tiene una baja probabilidad de suceder.

A diferencia de la fluorescencia, la emisión de fosforescencia (caracterizada por una constante de velocidad  $k_P$ ) persiste tras interrumpir la excitación. Se trata de una emisión que ocurre más lentamente que la fluorescencia, pero con menor intensidad. Para observar este tipo de emisión se han de realizar las mediciones a bajas temperaturas, en medios altamente viscosos o por adsorción sobre superficies sólidas<sup>56</sup>.

Por otro lado, los procesos no radiantes más habituales son la relajación vibracional, la conversión interna y el cruce intersistemas<sup>56</sup>.

### *Relajación vibracional (RV)*

Es una transmisión de un exceso de energía que se produce desde un nivel vibracional excitado a un nivel vibracional de menor energía del mismo estado electrónico. El exceso de energía es transferido gradualmente por colisión con las moléculas de disolvente vecinas, reflejándose en un aumento de la temperatura del medio prácticamente despreciable.

### *Conversión interna (CI)*

Son transiciones permitidas entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de spin en las que la molécula excitada pasa de un estado excitado de mayor energía a otro de menor energía. Cuanto menor sea la diferencia de energía entre los estados inicial y final, mayor será la probabilidad de que ocurra el proceso.

### *Cruce intersistema (CIS)*

Son transiciones prohibidas entre dos niveles vibracionales isoenergéticos de distinta multiplicidad de spin. La probabilidad de ocurrir está favorecida si los niveles vibracionales de los dos estados electrónicos se solapan o por la presencia de átomos pesados (como Pb o Br).

Los tiempos característicos de los procesos fotofísicos descritos anteriormente se recopilan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

<b>Proceso fotofísico</b>	<b>Tiempo(s)</b>
Absorción	$10^{-15}$
Relajación vibracional	$10^{-12} - 10^{-10}$
Tiempo de vida del estado excitado $S_1$	$10^{-10} - 10^{-7}$
Conversión interna	$10^{-11} - 10^{-9}$
Cruce intersistema	$10^{-10} - 10^{-8}$
Tiempo de vida del estado excitado $T_1$	$10^{-6}$

### **1.3.2. Procesos fotoquímicos.**

Los procesos fotoquímicos son aquellos en los que se producen cambios químicos inducidos por la absorción de radiación electromagnética, dando lugar a la formación de nuevas estructuras químicas con configuraciones más estables.

Estos procesos suceden como consecuencia de un aumento en la reactividad química de las moléculas tras ser excitadas, donde la fotorreactividad del compuesto inicial dependerá del entorno químico en el que se encuentren, de la fuente de energía y de la(s) función(es) química(s) presente(s) en la molécula.



Algunas reacciones fotoquímicas más relevantes son: reacciones de Norrish de tipo I y II, isomerizaciones E/Z, fotoadiciones, fotocicloadiciones, fotodimerizaciones, fotosustituciones, fototransposición de Fries (Foto-Fries), fotohalogenaciones, fototransposición de Claisen, reacciones de di- $\pi$ -metano, fotoreducciones, fotooxidaciones, etc.<sup>59, 60</sup>

En este contexto, las reacciones de fotooxidación son reacciones fotoquímicas de gran interés al involucrar al oxígeno molecular como principal agente oxidante, ya que, tras su excitación por transferencia de energía, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) con una gran capacidad oxidativa frente a sustratos orgánicos. A pesar de tener grandes aplicaciones en el campo de la fotodegradación de compuestos o contaminantes orgánicos, también interviene en los procesos de fotosensibilización, de los cuales se hablará más adelante.

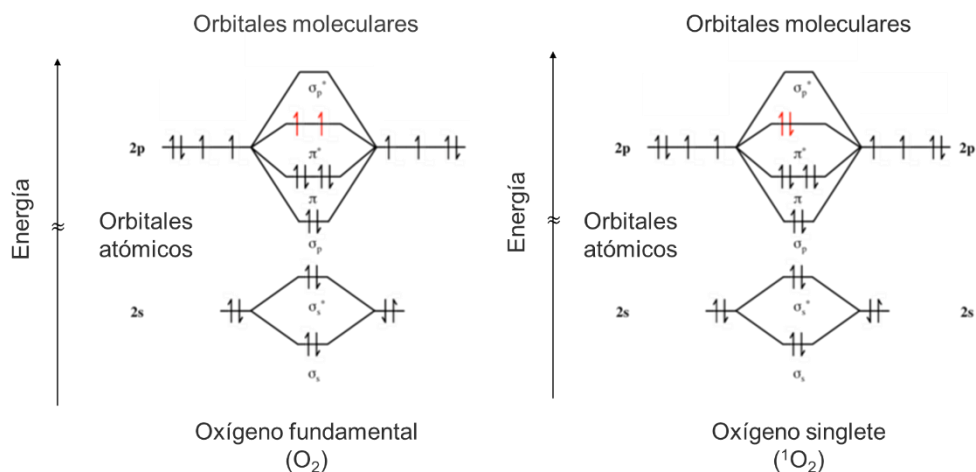
### 1.3.3. Oxígeno singlete.

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es una molécula homonuclear que, a pesar de su aparente simplicidad, exhibe propiedades bastante inusuales con respecto a su comportamiento magnético, espectroscopía, procesos de transferencia de energía y reactividad química. Estas singularidades son debidas a las configuraciones electrónicas de sus estados fundamental y excitado, ya que a diferencia de otras moléculas homonucleares, el  $O_2$  en su estado fundamental tiene una configuración electrónica de capa abierta con dos electrones desapareados ocupando orbitales moleculares degenerados, lo que provoca que el estado fundamental del  $O_2$  sea un triplete ( $^3O_2$ )<sup>61</sup> (Figura 8).

El oxígeno singlete, el estado excitado del oxígeno molecular, ha sido un tema primordial de investigación desde su descubrimiento por Kautsky en 1931 principalmente por:<sup>62</sup>

1. Ser un intermedio reactivo cuyo tamaño le permite difundirse fácilmente a través de sistemas con elevada viscosidad, como polímeros o estructuras celulares.

2. Poseer una estructura electrónica única con una gran energía, lo que lo hace altamente reactivo frente a una gran variedad de sustratos ricos en electrones.
3. Tener un tiempo de vida lo suficientemente largo como para poder reaccionar con biomoléculas diana.



**Figura 8.** Diagrama de orbitales atómicos y moleculares del oxígeno en estado fundamental ( $O_2$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) Figura adaptada de Internet.

Uno de los grandes avances en la comunidad científica ha sido el desarrollo de herramientas para monitorizar la cinética de desactivación del oxígeno singlete ( $^1O_2$ ,  $^1\Delta_g$ ) gracias a su emisión de fosforescencia a 1270 nm (lo que corresponde a una energía de 94,3 kJ/mol,  $^1O_2 \rightarrow ^3O_2 + h\nu$ ) en experimentos de tiempo resuelto. Esto ha permitido determinar que sus parámetros fotofísicos, como su constante de velocidad de desactivación ( $k_\Delta$ ) o el tiempo de vida ( $\tau_\Delta$ ), dependen en gran medida del entorno en el que se genera el  $^1O_2$ <sup>63</sup>. De entre todas las vías de desactivación vistas anteriormente, la que más influencia tiene en el tiempo de vida del  $^1O_2$  es la desactivación por transferencia de energía vibracional a las moléculas del entorno. Cuanto mayor sea la similitud entre la energía vibracional del disolvente y la energía de desactivación del  $^1O_2$ , más rápido se producirá este proceso. Es por ello que la desactivación del  $^1O_2$  se ve favorecida en disolventes que contienen enlaces O-H

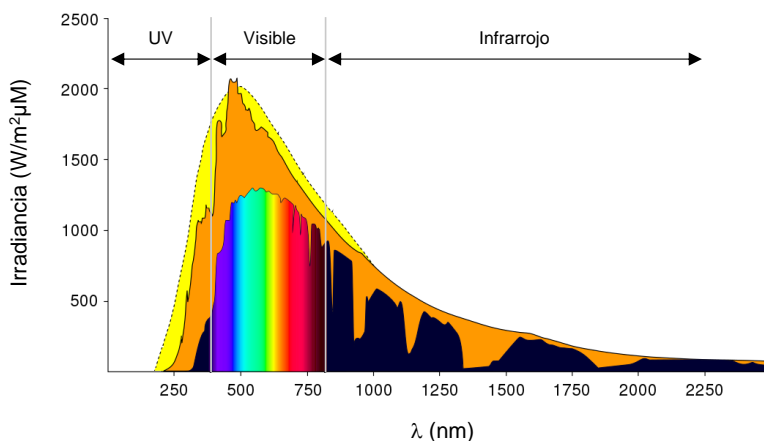
(como el H<sub>2</sub>O) mientras que se ve reducida en aquellos que contienen enlaces C-H o C-F, aumentando el tiempo de vida de esta especie excitada<sup>64</sup>.

A pesar de poderse generar selectivamente oxígeno singlete por excitación directa del O<sub>2</sub> con radiación infrarroja a 1270 nm, este método requiere el uso de un potente láser de infrarrojo diseñado específicamente para emitir radiación en esa longitud de onda y, además, es un proceso muy ineficiente, ya que, debido a la regla del espín, la transición electrónica de triplete a singlete es una transición prohibida, cuya probabilidad de ocurrencia es muy baja<sup>65-67</sup>. Sin embargo, sí que es posible generar <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por interacción con aceptores químicos que sean capaces de transferir energía al O<sub>2</sub>. Estas sustancias denominadas fotosensibilizadores son capaces de absorber energía a longitudes de onda más bajas y de transmitir eficientemente dicha energía al oxígeno molecular mediante una transferencia de energía triplete-triplete<sup>68</sup>.

Con todo ello, el oxígeno singlete es una de las especies reactivas de oxígeno más estudiadas en la actualidad, ya que se comporta como una especie electrófila altamente oxidante, capaz de transformar a gran variedad de sustratos orgánicos y biológicos mediante reacciones de fotosensibilización de tipo II, donde, por transferencia de energía desde el agente fotosensibilizante hacia el oxígeno molecular, se genera esta especie reactiva capaz de generar daño oxidativo a las biomoléculas. Este tipo de reacción fotodinámica se verá con más detalle en el apartado de fototoxicidad (véase apartado 1.4.4.).

## 1.4. Fotosensibilización.

El Sol constituye la principal fuente de energía y es responsable del desarrollo de la vida en nuestro planeta, el cual emite energía en un amplio espectro electromagnético (luz ultravioleta, visible e infrarrojo). No obstante, solo un 56 % de esta radiación solar llega a la superficie terrestre, ya que la mayoría es filtrada por la capa de ozono (UVC y gran parte de UVB) y reflejada por la atmósfera (infrarrojo)<sup>69</sup>. Esto permite que las radiaciones de longitud de onda más cortas, que son altamente energéticas y nocivas para el ser humano, no alcancen la superficie terrestre, mientras que las radiaciones de longitud de onda más largas sean capaces de alcanzarla. Como resultado, la luz solar que alcanza la superficie terrestre está compuesta principalmente por un 2 % de luz ultravioleta (100 – 400 nm), 32 % de luz visible (400 – 700 nm) y 66 % de luz infrarroja (700 nm – 1 mm), aproximadamente<sup>70</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Espectro electromagnético de la radiación solar terrestre.

### 1.4.1. Daño fotosensibilizado a las biomoléculas.

Durante las últimas décadas, las reacciones de fotosensibilización a biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, han demostrado ser responsables de gran parte de los efectos biológicos nocivos asociados a la radiación UV/vis,

como la letalidad celular, la carcinogénesis y el envejecimiento, pero también están vinculados a efectos beneficiosos, tales como las terapias fotodinámicas (*Photodynamic therapy*, PDT) para el tratamiento de tumores, o la fotoinactivación dinámica (*Photodynamic inactivation*, PDI) de microorganismos.

La activación de un fotosensibilizador por la luz solar desencadena una cascada de eventos químicos que finalmente pueden repercutir en trastornos biológicos significativos, como fototoxicidad, fotoalergia y fotocarcinogénesis<sup>71</sup>. De esta forma, el daño celular fotoinducido puede sucederse por modificación directa de biomoléculas o la participación de especies reactivas de oxígeno. Como resultado, los principales componentes celulares como los lípidos insaturados, las proteínas o las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos pueden verse alterados; en caso de que los mecanismos de reparación no sean eficientes, pueden ocasionarse lesiones irreversibles.

En la práctica se han establecido diversos métodos para evaluar el daño fotosensibilizado hacia lípidos, proteínas y ADN de forma sencilla, versátil y económica.

### *Lípidos*

Los lípidos son macromoléculas constituidas por cadenas hidrocarbonadas poliinsaturadas que poseen un papel crucial en el almacenamiento de energía y el desarrollo de membranas celulares. Sin embargo, la peroxidación lipídica generada por la acción oxidativa de ROS provoca la generación de varios subproductos que originan el deterioro de las propiedades de las membranas celulares (disminución del grosor, incremento de la fluidez, etc.), lo que conlleva el desarrollo de muchos procesos patológicos, como arterosclerosis, carcinogénesis o muerte celular<sup>72, 73</sup>.

### *Proteínas*

Las proteínas son macromoléculas formadas por aminoácidos que realizan funciones indispensables para el desarrollo del ciclo de vida celular.

Desafortunadamente, son objetivos significativos para el daño oxidativo inducido por ROS. Las proteínas oxidadas son relativamente insolubles y su deposición intracelular está asociado con el envejecimiento y con varios trastornos neurodegenerativos e inflamatorios<sup>74</sup>. Además, contribuyen significativamente a la toxicidad inducida por la radiación y la mutagénesis.

### ADN

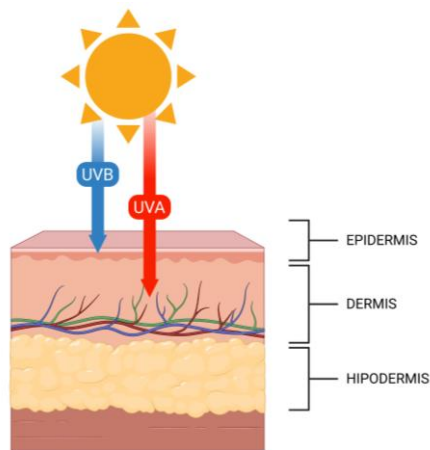
El ADN es la macromolécula que contiene toda la información genética necesaria para el buen desarrollo y funcionamiento de las células, y aunque la mayoría del daño que sufre el material genético es reparado eficientemente por una compleja maquinaria enzimática<sup>75</sup>, las lesiones no reparadas adecuadamente pueden acumularse y dar lugar a modificaciones del ADN y, posteriormente, mutaciones, generando en última estancia carcinogénesis<sup>75, 76</sup>. En este sentido, los procesos de fotosensibilización con ADN resultan de gran interés, incluso en los casos donde la fototoxicidad está predominantemente mediada por otras moléculas diana.

El daño inducido por fotosensibilizadores puede clasificarse en (1) reacciones directas de las moléculas excitadas con el ADN, (2) reacciones mediadas por ROS y (3) reacciones que impliquen otros intermedios secundarios, que tienen como resultado la generación de fotoaductos por reacciones de fotocicloaddición y la oxidación de bases nitrogenadas<sup>77</sup>.

#### **1.4.2. Reacciones cutáneas fotosensibilizadas.**

Los efectos nocivos de la luz solar en los sistemas biológicos se deben casi en su totalidad a la radiación ultravioleta, ya que esta luz posee la energía necesaria para producir quemaduras solares, envejecimiento cutáneo, reacciones fotoquímicas y alteraciones cutáneas, oftalmológicas e inmunológicas, tanto locales como sistémicas<sup>78, 79</sup>(Figura 10). Entre las reacciones cutáneas adversas se incluyen eritema, prurito, urticaria, mutaciones genéticas, melanoma, cáncer de piel no melanoma, etc.<sup>80, 81</sup>

La radiación solar ultravioleta terrestre está compuesta en su mayoría por radiación UVA (95 %). Sin embargo, aunque la radiación UVB (5 %) es capaz de reaccionar directamente con las biomoléculas y generar un daño directo, la radiación UVA es la principal responsable del desarrollo de las reacciones de fotosensibilidad<sup>82</sup>, entendiéndose estas como respuestas anormales de la piel tras una exposición a la radiación solar, lo que conlleva al desarrollo de trastornos en la piel. Estas se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: (1) idiopáticas o de base inmunológica, (2) por reparación defectuosa del ADN, (3) inducida por agentes químicos y (4) dermatitis fotoagravada<sup>70, 83</sup>.



**Figura 10.** Penetración en la piel de la radiación ultravioleta.

La piel es un órgano multifuncional metabólicamente activo con una arquitectura compleja que actúa principalmente como una barrera protectora frente a los microorganismos y el ambiente externo. Para un adulto, tiene un peso medio de 4 kg y una superficie de 1,5 – 2 m<sup>2</sup>, siendo el órgano más extenso del cuerpo humano, llegando a representar el 16 % del peso corporal<sup>84</sup>.

Entre las numerosas funciones de la piel, se encuentran<sup>85-87</sup>:

- Regulación de la temperatura corporal.
- Función de homeostasis.

- Protección frente a los efectos perjudiciales causados por la radiación solar ultravioleta, en especial de la radiación UVB.
- Función barrera frente a infecciones y sustancias tóxicas.
- Eliminación de sustancias tóxicas por medio del sudor.
- Percibir cambios en el entorno mediante la captación de estímulos sensoriales.
- Función endocrina: serotonina, melatonina, N-acetilserotonina, etc.
- Síntesis de la vitamina D3, precursor de la 1,25-Dihidroxi-vitamina D3.

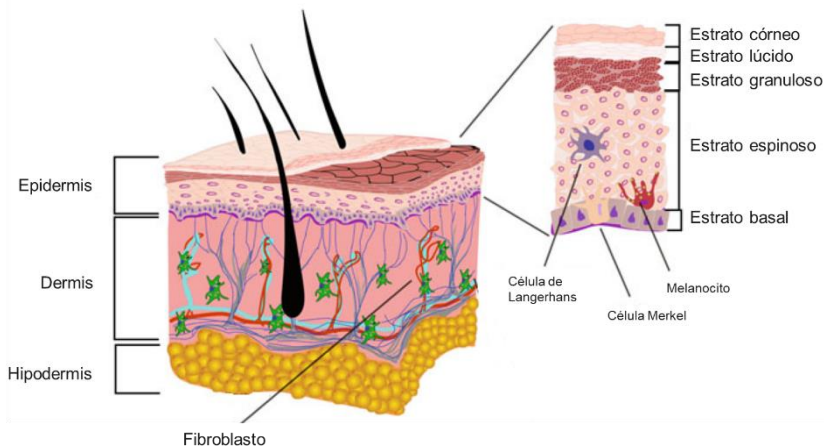
Estructuralmente, la piel es una estructura multifásica dinámica, cuyas propiedades biológicas y mecánicas varían a lo largo del ciclo vital y de las condiciones socio-ambientales. A nivel macroscópico, la piel es considerada como un conjunto de múltiples capas agrupables en tres estructuras bien diferenciadas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 11)<sup>88</sup>.

La epidermis, la capa más externa de la piel, es una estructura no vascularizada en constante regeneración que está compuesta principalmente por epitelio escamoso rico en filagrina y queratina. Se subdivide en cuatro estratos (basal, espinoso, granuloso y córneo), cuyas funciones y composiciones están caracterizadas por el ciclo celular de los queratinocitos, que son las células más abundantes de la epidermis (90 – 95 %). Además, existen poblaciones más pequeñas de otras células: melanocitos (3 %), células de Langerhans (2 %) y células Merkel (0,5 %)<sup>84, 88, 89</sup>.

La dermis es la capa intermedia de la piel y se compone principalmente de una matriz extracelular densa que ofrece soporte a tejido vascular, las células nerviosas sensoriales y diferentes orgánulos (glándulas sudoríparas, folículos pilosos, etc.). Esta matriz extracelular está poblada principalmente por fibroblastos, que son las células encargadas de sintetizar esta matriz extracelular, conformada principalmente por elastina y colágeno, lo que le confiere las propiedades resistentes y elásticas características de la piel<sup>84, 88, 89</sup>.



La hipodermis, o tejido adiposo subcutáneo, es la capa interna de la piel compuesta principalmente por adipocitos, células encargadas de almacenar energía y proporcionar aislamiento térmico, que se organizan en lóbulos separados por tejido conjuntivo fibroso. Estos lóbulos se encuentran separados por septos por donde circula una red microvascular encargada de proporcionar oxígeno y nutrientes, así como nervios y vasos linfáticos<sup>84, 88</sup>.



**Figura 11.** Estructura de la piel humana. Figura adaptada de la referencia 88.

A continuación, se detallarán las dos líneas celulares más abundantes de la piel: los queratinocitos y los fibroblastos.

### *Queratinocitos.*

Los queratinocitos son las células epidérmicas más abundantes en humanos. Estas células escamosas de origen ectodérmico tienen un ciclo de vida aproximado de 28 días desde que se generan en el estrato basal del epitelio hasta que alcanzan la parte más superficial, el estrato córneo, donde se transforman en corneocitos y acaban por desprenderse o eliminarse por fricción en un proceso denominado descamación<sup>84, 90</sup>.

Estas células se caracterizan por: (1) liberar muy poca matriz extracelular, lo que provoca que las membranas celulares de queratinocitos adyacentes estén muy

próximas y favorece la cohesión e integridad de la epidermis, (2) sintetizar queratina, la proteína estructural más importante de éstos, (3) modificar su ratio de replicación tras una herida, y (4) ser la célula con mayor capacidad de biotransformación de la piel al tener el mayor reservorio de actividad del citocromo P450 de la piel<sup>90-92</sup>.

La morfología de estas células es variable a lo largo de su ciclo celular debido a un proceso conocido como queratinización, donde progresivamente los queratinocitos se diferencian y sus características y funciones cambian desde que son engendrados por las células madre basales hasta que alcanzan la parte más superficial, donde mueren y se desprenden. Estas diferencias morfológicas se manifiestan como capas o estratos que agrupan a queratinocitos en un estado similar de diferenciación. Estos estratos ordenados del más interno al más superficial son basal, espinoso, granuloso y córneo, cuyas principales características se recogen en la Tabla 3<sup>84, 86, 90, 93, 94</sup>.

**Tabla 3.** Características principales de los estratos epiteliales.

<b>Estrato</b>	<b>Características</b>
Basal	Formada por células troncales (células madre adultas) Firmemente adheridas a la membrana basal Proliferación y diferenciación variable
Espinoso	Formada por queratinocitos de forma poliédrica Los queratinocitos inician la síntesis de queratina Resistencia epidérmica debida a la alta cohesión celular
Granuloso	Comienza la degradación de los queratinocitos Síntesis de gránulos proteicos que estimula la aglomeración Liberación de lípidos y proteínas con efecto barrera
Córneo	Formado por corneocitos (queratinocitos degenerados) Se forma una barrera lipídica protectora impermeable

Al ser la célula mayoritaria de la capa más externa de la piel, las funciones de los queratinocitos están orientadas fundamentalmente a la creación de una barrera entre el medio externo e interno del organismo, protegiéndolo frente a daños físicos, químicos, térmicos y la luz ultravioleta, así como evitar la desecación, liberar enzimas con actividad antimicrobiana y desplazarse por la superficie de una herida para sellarla y facilitar su recuperación<sup>95</sup>. Cabe destacar que los queratinocitos participan en la protección frente a la radiación ultravioleta, ya que estimulan a los melanosomas de los melanocitos para la síntesis de melanina, un pigmento fotoprotector capaz de absorber la radiación ultravioleta nociva y disiparla en forma de calor, evitando así el daño al ADN<sup>96</sup>.

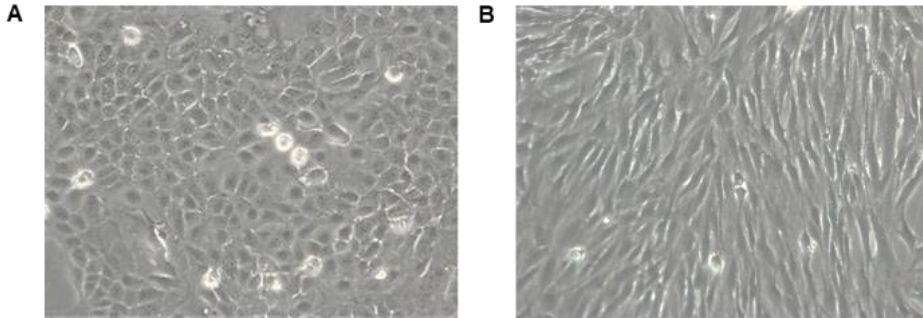
#### *Fibroblastos.*

Los fibroblastos dérmicos son un componente esencial de la piel cuya función principal es la síntesis, el mantenimiento y la organización de la matriz extracelular de la dermis. Además, gracias a su capacidad para comunicarse con otras células por contacto físico o mediante la secreción de sustancias, desempeñan un papel crucial en la regulación de la fisiología de la piel<sup>97</sup>.

Estas células fusiformes de origen ectodérmico y mesodérmico son el tipo celular característico y más abundante del tejido conectivo y, dada la gran versatilidad de que presentan, su morfología es muy variable dependiendo del órgano donde se encuentren y del ambiente donde se desenvuelven<sup>98</sup>. No obstante, aunque se hace una distinción entre fibroblasto y fibrocito en función del estado metabólico y capacidad proliferativa en el que se encuentre, siendo el fibroblasto el estado activo y proliferante, generalmente se tienen a hablar de fibroblasto para referirse a ambas formas<sup>99</sup>.

Entre las múltiples funciones que desempeñan, los fibroblastos se caracterizan por (1) sintetizar y mantener todos los componentes de la matriz extracelular (colágeno, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos, etc.), (2) contribuir al mantenimiento de la homeostasis de la piel, y (3) intervenir activamente en la cicatrización de heridas<sup>98</sup>.

En base a todo lo expuesto anteriormente, las diferencias morfológicas y funcionales entre queratinocitos y fibroblastos se pueden observar fácilmente a nivel microscópico (Figura 12).



**Figura 12.** Microscopía de contraste de fases (x10) de queratinocitos (A) y fibroblastos (B).

Por tanto, dado que los queratinocitos son las células epiteliales más expuestas a la luz solar y presentan una mayor capacidad metabólica, en esta tesis doctoral se utilizarán los queratinocitos humanos para la evaluación del potencial fototóxico de los inhibidores de la PARP en presencia y ausencia de una dosis de irradiación UVA.

#### **1.4.3. Fotosensibilidad inducida por fármacos.**

Las reacciones de fotosensibilidad o fotosensibilización inducidas por xenobióticos se producen al interactuar éstos con la radiación electromagnética, provocando lesiones en la piel<sup>79</sup>.

Actualmente, el número de casos de fotosensibilización está en constante aumento debido a una excesiva exposición a luz solar y/o a la luz ultravioleta procedente de fuentes artificiales y también al aumento del consumo de sustancias fotosensibilizantes como suplementos alimentarios, productos farmacéuticos y cosméticos<sup>100</sup>.

Los agentes fotosensibilizantes son sustancias químicas, introducidas por *vía* tópica o sistémica, que poseen la habilidad de absorber radiación que es capaz de penetrar en la piel (UV/vis), favoreciendo su fotodegradación para formar fotoproductos

estables y/o especies reactivas de oxígeno (radicales libres, oxígeno singlete, etc.) capaces de interactuar con biomoléculas y originar reacciones cutáneas adversas, tales como eritema, prurito, urticaria, mutaciones genéticas, melanoma, cáncer de piel no melanoma, etc.<sup>80, 81</sup> Dentro este último grupo destacan el carcinoma basocelular y espinocelular o escamoso, dos tipos de cánceres que se producen por el daño al ADN producido como consecuencia de la exposición de las células epiteliales a la radiación UV, dando lugar a un crecimiento anormal y descontrolado<sup>101</sup>. Estos cánceres de piel son los que afectan con mayor frecuencia en humanos, cuya incidencia ha ido aumentando en las últimas décadas, estimándose que, de acuerdo con la GBD (*global burden of disease*), en 2019 se diagnosticaron aproximadamente 6,5 millones de nuevos casos de este tipo de cáncer<sup>102</sup>.

De entre todas las reacciones de fotosensibilidad mediadas por xenobióticos, aquellas inducidas por fármacos son las más frecuentes en la población, ya que el riesgo de inducir reacciones de fotosensibilidad afecta a cientos de ellos actualmente en uso. Esta tesis se centra en las reacciones de fotosensibilidad inducidas por agentes exógenos, concretamente por los fármacos inhibidores de la PARP-1.

En este contexto, las reacciones de fotosensibilidad inducidas por fármacos son frecuentes en la práctica clínica, representando el 8 % de los casos de reacciones adversas cutáneas asociadas a fármacos<sup>103, 104</sup>. A pesar de que se estima que más de 300 fármacos han sido notificados como fotosensibilizantes (Tabla 4), establecer una relación entre el consumo de un fármaco y su exposición a la luz solar no resulta sencillo y solamente el potencial fotosensibilizante de unos pocos ha sido descrito rigurosamente<sup>105</sup>. Por ello, es primordial investigar esta combinación con el fin de establecer pautas apropiadas para prevenir o tratar adecuadamente estas reacciones adversas.

La reacción de fotosensibilización se inicia con la absorción de un fotón por parte del agente fotosensibilizante, lo que lo promueve a un estado excitado de mayor

energía (generalmente, estado excitado singlete). Este estado excitado se caracteriza por ser bastante inestable, con un tiempo de vida del orden de nanosegundos, y es desactivado rápidamente por procesos radiantes (fluorescencia) o no radiantes (conversión interna o cruce intersistema), descritos anteriormente. Cuando se produce un cruce intersistema, la molécula excitada pasa a un estado excitado triplete, el cual es mucho más estable y con un tiempo de vida superior al del singlete. La mayoría de las reacciones de fotosensibilización suceden desde el triplete, ya que es un intermedio con una gran reactividad y un tiempo de vida relativamente largo (del orden de microsegundos)<sup>80</sup>.

**Tabla 4.** Tabla de los principales fármacos fotosensibilizantes.

<b>Fármaco fotosensibilizante</b>	<b>Ejemplo(s)</b>
Antiácidos	Omeprazol, ranitidina.
Antiarrítmicos	Amiodarona, captopril, quinidina...
Antibióticos	Macrólidos (azitromicina, eritromicina...), quinolonas (Ácido nalidíxico, ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacina...), sulfonamidas (sulfametoxazol, sulfasalazina...), tetraciclinas (clortetraciclina, doxiciclina...)
Antidepresivos	Tricíclicos (amoxapina, amitriptilina, clomipramina, doxepina, nortriptilina, trimipramina...), ISRS (fluoxetina, paroxetina, sertralina, trazodona...), otros (maprotilina, mirtazapina, etc.)
Antidiabéticos orales	Sulfonilureas (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, glisentida, tolbutamida...)
Antifúngicos	Griseofulvina, ketoconazol, voriconazol.
Antihipertensivos	Antagonistas del calcio (amlodipino, felodipina...), IECA (captopril, enalapril...), otros (losartán, etc.)
Antihistamínicos	Azatadina, carbinoxamina, cetirizina, clorfenamina, difenhidramina, doxilamina, ebastina, loratadina...
Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	Benzidamida, benoxaprofeno, etofenamato, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, piroxicam...
Antipsicóticos	Fenotiazinas (clorpromazina, tioridazina...) otros (clozapina, clotiapina, loxapina, olanzapina...)
Ansiolíticos	Barbitúricos (pentobarbital, secobarbital...), benzodicepinas (alprazolam, diazepam...)
Diuréticos	Diuréticos de asa (furosemida, piretanida), tiazidas (hidroclorotiazida, clortalidona...)
Hipolipemiantes	Estatinas (atorvastatina, lovastatina, pravastatina...), fibratos (clofibrato, fenofibrato...)

Así, será necesario un cruce intersistema singlete – triplete favorable para que un fármaco actúe como fotosensibilizador. En función del mecanismo de acción, se puede diferenciar entre fototoxicidad y fotoalergia.

#### **1.4.4. Fototoxicidad y fotoalergia.**

Las reacciones fototóxicas son reacciones dosis-dependientes que suceden tras la interacción con la luz y absorción de un fotón por parte del fotosensibilizador, generando un intermedio excitado altamente reactivo capaz de inducir un daño directo a las principales estructuras celulares. Clínicamente se caracterizan por manifestarse tras la primera exposición del fármaco a la luz en forma de una quemadura solar exagerada o una hiperpigmentación de la piel localizada en las zonas expuestas a la luz solar<sup>105-107</sup>.

Las reacciones fotoalérgicas son reacciones inmunológicas de tipo retardado, independientes de la dosis radiante y/o farmacológica, que se producen cuando, tras una pequeña exposición a la radiación y una coexposición previa, el fotosensibilizador sufre una transformación química, dando lugar a un hapteno susceptible de conjugarse con una proteína, generando un antígeno que desencadena una respuesta inmune retardada o de hipersensibilidad de tipo IV. Clínicamente se caracterizan por presentar una respuesta tardía (2-10 días) y manifestándose en forma de eczema alérgico, con prurito, eritema e incluso vesiculación y ampollas en casos más severos, en las zonas fotoexpuestas, pudiendo llegar a afectar a zonas no expuestas a la radiación<sup>105-107</sup>.

Las principales diferencias entre la fototoxicidad y fotoalergia se recogen en la Tabla 5.



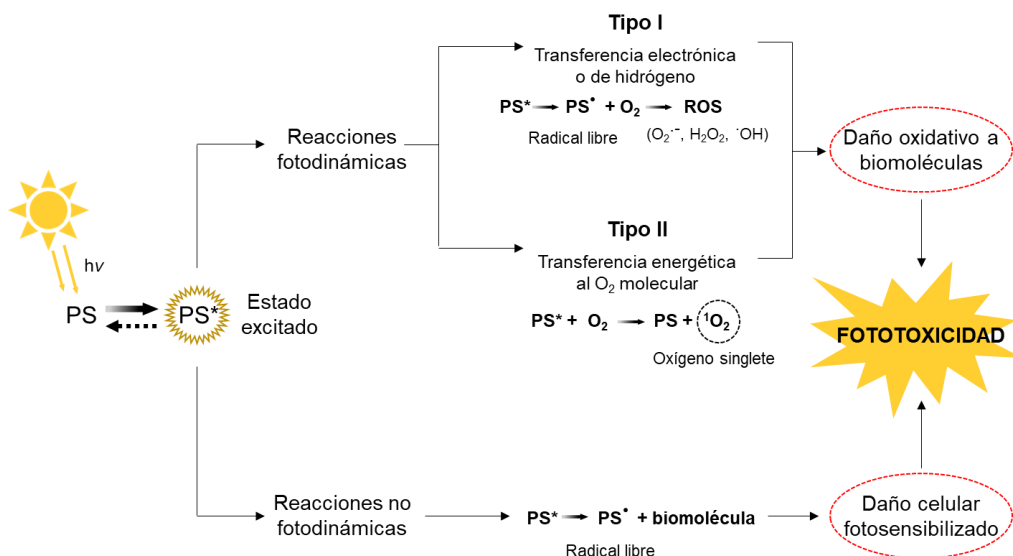
**Tabla 5.** Principales diferencias entre la fototoxicidad y fotoalergia.

<b>Fototoxicidad</b>	<b>Fotoalergia</b>
Alta incidencia	Poco frecuentes
Afecta a áreas expuestas	Afecta a cualquier área
Dosis-dependiente	No dependiente de la dosis
Daño directo a biomoléculas	Respuesta inmune retardada (tipo IV)
Rápida aparición	Aparición retardada
Aparición de quemaduras solares	Aparición de eczema, prurito

Dado que las reacciones de fototoxicidad inducidas por fármacos son más frecuentes que las de fotoalergia, en esta tesis se centrará el foco en la fototoxicidad inducida por fármacos tras su exposición a la radiación solar. Por ello, a continuación, se profundiza en el fenómeno de la fototoxicidad.

La fototoxicidad inducida por fármacos es una reacción adversa que sucede cuando el fármaco alcanza las células epiteliales y absorbe luz capaz de penetrar la piel (generalmente UVA)<sup>79, 108</sup>. Como resultado, se genera un compuesto fotoactivo altamente reactivo que generará un daño directo a las biomoléculas y orgánulos celulares, que normalmente se manifiestan en las zonas afectadas de la piel. Este daño dependerá de la cantidad de fármaco y de la intensidad de la irradiación recibida<sup>79, 109</sup>.

Atendiendo al mecanismo mediante el cual se produce el daño celular, las reacciones de fototoxicidad se clasifican en reacciones fotodinámicas y no fotodinámicas, en relación a su interacción con el oxígeno (Figura 13).



**Figura 13.** Mecanismo de la fototoxicidad (PS = fotosensibilizador).

Las reacciones fotodinámicas son dependientes del oxígeno, donde la energía del fotosensibilizador es transferida directa o indirectamente al oxígeno, comúnmente conocidas como Tipo II y Tipo I, respectivamente. En las reacciones de Tipo I, la formación de radicales libres por transferencia electrónica o abstracción de hidrógeno origina, en presencia de oxígeno, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conlleva a la generación de un daño oxidativo directo a las biomoléculas (ADN, lípidos o proteínas). Por otro lado, en las reacciones de tipo II se produce una transferencia de energía hacia el oxígeno molecular, lo que conlleva la generación de oxígeno singlete, una ROS capaz de generar de nuevo daño oxidativo a las biomoléculas<sup>80, 110</sup>.

Estas reacciones son independientes del contacto, es decir, no requieren un encuentro entre el fotosensibilizador y el sustrato, donde la reacción puede ocurrir incluso cuando ambas especies están separadas físicamente si el intermedio reactivo es capaz de alcanzar el sustrato.

Las reacciones no fotodinámicas por su parte, se caracterizan por no depender del oxígeno, donde la transferencia de energía entre el fármaco fotosensibilizante y un

sustrato dará lugar a un daño celular no oxidativo<sup>79</sup>, generalmente por transferencia de energía triplete-triplete (*triplet-triplet energy transfer*, TTET) que conduce a la formación de fotoaductos mediante reacciones de fotocicloaddición.

En las reacciones no fotodinámicas, el fotosensibilizador excitado reacciona directamente con el sustrato y pueden considerarse como procesos dependientes del contacto donde, a nivel celular, estas reacciones solo son eficientes si el fotosensibilizador y el sustrato están cerca uno del otro. A excepción de que exista una asociación previa entre las dos moléculas, en general estas reacciones son procesos dinámicos, donde la velocidad está controlada por la difusión.

En base a la gran cantidad de fármacos fotosensibilizantes descritos hasta el momento y, con el objetivo de prevenir las reacciones adversas cutáneas fotoinducidas, el estudio de la fotosensibilidad a fármacos resulta imprescindible para una correcta evaluación de la seguridad asociada a su consumo, y debe ser necesariamente objeto de estudio para cualquier producto farmacéutico con algún principio activo susceptible de provocar este tipo de reacciones. En este contexto, se han establecido directrices de actuación con fin de identificar el riesgo potencial de fármacos que pueden causar reacciones de fotosensibilización tras su exposición a la luz solar. Actualmente, el ensayo de captación de rojo neutro (*Neutral Red Uptake*, NRU) es la prueba *in vitro* más recomendada y apropiada para evaluar el potencial fototóxico de un compuesto fotosensibilizante, que compara la viabilidad celular de una línea celular inmortalizada de fibroblastos de ratón (BALB/c 3T3) tras exponerlo a un compuesto en presencia y ausencia de una dosis de irradiación UV/vis<sup>100, 111</sup>.

No obstante, el ensayo 3T3 NRU solo proporciona una estimación del potencial fototóxico de la sustancia estudiada. No está diseñado ni para predecir otros efectos adversos derivados de la acción combinada del fotosensibilizante y la luz, ni proporciona información sobre los mecanismos celulares, moleculares y bioquímicos implicados en la fototoxicidad<sup>111</sup>.

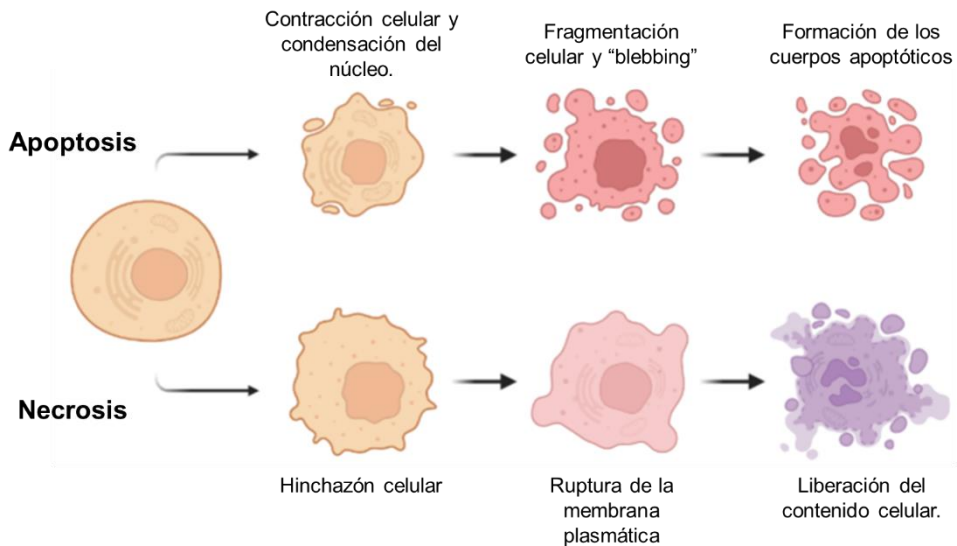
## 1.5. Mecanismo de muerte celular.

En los organismos pluricelulares existe un esfuerzo constante por mantener un equilibrio homeostático entre el número de nuevas células generadas por mitosis y el número de células dañadas u obsoletas que son eliminadas del cuerpo. La apoptosis, conocida como la muerte celular programada, es el proceso de regulación que permite al organismo controlar el desarrollo y crecimiento celular mediante la degeneración controlada de células anómalas o defectuosas desencadenada por señales extracelulares y/o intracelulares, manteniendo un equilibrio en la población celular de tejidos y órganos en los organismos pluricelulares<sup>112</sup>.

Mecanísticamente, la apoptosis es una cascada de procesos bioquímicos coordinados mediados por las enzimas caspasa, una serie de endoproteasas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos de proteínas estructurales clave. Durante el proceso de apoptosis, la célula sufre importantes cambios morfológicos, como la contracción celular, la condensación de la cromatina (picnosis) y el plegamiento de la membrana o “blebbing”, lo que conlleva a la fragmentación y división de la célula en porciones independientes denominados cuerpos apoptóticos, constituidos por citoplasma con orgánulos celulares y/o fragmentos nucleares envueltos en una membrana plasmática intacta. Finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados y degradados por macrófagos (Figura 14). De esta forma, se consigue la eliminación de células sin liberar sustancias al medio extracelular, evitándose la aparición de procesos inflamatorios y la generación de un daño a las células vecinas mediante procesos necróticos secundarios<sup>113, 114</sup>.

A pesar de la alta complejidad y sofisticación de los mecanismos de la apoptosis, existen dos vías apoptóticas principales reportadas hasta la fecha, la vía extrínseca o del receptor de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Ambos procesos están mediados por la actividad de las enzimas caspasa, las cuales se expresan inicialmente en su forma inactivada (procaspasa), para regular su actividad, y son ampliamente clasificadas en iniciadoras, activadoras o inflamatorias, donde las

caspasas iniciadoras (principalmente las caspasas-8 y -9) son activadas por dimerización tras diferentes estímulos, mientras que las caspasas efectoras (principalmente las caspasas-3, -6 y -7) una vez activadas por las caspasas iniciadoras, desencadenan los procesos bioquímicos que producen la muerte celular<sup>115-117</sup>. Por su parte, las caspasas inflamatorias (caspasas-1, -4 y -5) intervienen como mediadores de respuestas inmunitarias que intervienen en los procesos inflamatorios<sup>117</sup>.



**Figura 14.** Esquema de los procesos de apoptosis y necrosis.

Sin embargo, en algunos casos, en función del tipo y/o el grado del estímulo no es posible la apoptosis y las células mueren por necrosis, un proceso tóxico, descontrolado y energéticamente independiente que provoca la hinchazón celular, la disgregación de los orgánulos celulares, la formación de ampollas citoplasmáticas y eventualmente, la ruptura de la membrana celular, liberándose el contenido citoplasmático celular al tejido circundante y activando una respuesta inflamatoria (Figura 14)<sup>112, 117, 118</sup>.

## 1.6 Bibliografía.

1. Understanding cancer. Disponible online: <https://www.cancer.gov/> (último acceso 04/04/2023).
2. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? Disponible online: <https://seom.org/> (último acceso 04/04/2023).
3. Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages. Disponible online: <https://gco.iarc.fr/today/home> (último acceso 04/04/2023).
4. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209-249.
5. López, M. M.; Cardona, A. F. *Medicina* **2021**, *42* (4), 528-562.
6. Caldecott, K. W. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9* (8), 619-631.
7. Langelier, M. F.; Planck, J. L.; Roy, S.; Pascal, J. M. *Science* **2012**, *336* (6082), 728-732.
8. Rouleau, M.; Patel, A.; Hendzel, M. J.; Kaufmann, S. H.; Poirier, G. G. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10* (4), 293-301.
9. Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (10), 610-621.
10. Martí, J. M.; Fernández-Cortés, M.; Serrano-Sáenz, S.; Zamudio-Martinez, E.; Delgado-Bellido, D.; Garcia-Diaz, A.; Oliver, F. J. *Cancers* **2020**, *12* (3).
11. D'Amours, D.; Desnoyers, S.; D'Silva, I.; Poirier, G. G. *Biochem.* **1999**, *342* (2), 249-268.
12. Jungmichel, S.; Rosenthal, F.; Altmeyer, M.; Lukas, J.; Hottiger, M. O.; Nielsen, M. L. *Mol. Cell* **2013**, *52* (2), 272-285.
13. Krietsch, J.; Rouleau, M.; Pic, É.; Ethier, C.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Masson, J. Y.; Poirier, G. G.; Gagné, J. P. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34* (6), 1066-1087.

14. Slade, D.; Dunstan, M. S.; Barkauskaite, E.; Weston, R.; Lafite, P.; Dixon, N.; Ahel, M.; Leys, D.; Ahel, I. *Nature* **2011**, *477* (7366), 616-620.
15. Koh, D. W.; Lawler, A. M.; Poitras, M. F.; Sasaki, M.; Wattler, S.; Nehls, M. C.; Stöger, T.; Poirier, G. G.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (51), 17699-17704.
16. Rosenthal, F.; Feijs, K. L.; Frugier, E.; Bonalli, M.; Forst, A. H.; Imhof, R.; Winkler, H. C.; Fischer, D.; Cafilisch, A.; Hassa, P. O.; Lüscher, B.; Hottiger, M. O. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20* (4), 502-507.
17. Sharifi, R.; Morra, R.; Appel, C. D.; Tallis, M.; Chioza, B.; Jankevicius, G.; Simpson, M. A.; Matic, I.; Ozkan, E.; Golia, B.; et al. *EMBO J.* **2013**, *32* (9), 1225-1237.
18. Diefenbach, J.; Bürkle, A. *Cell. Mol. Life Sci. : CMLS* **2005**, *62* (7-8), 721-730.
19. Chambon, P.; Weill, J. D.; Mandel, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11* (1), 39-43.
20. Clark, J. B.; Ferris, G. M.; Pinder, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *238* (1), 82-85.
21. Purnell, M. R.; Whish, W. J. *Biochem. J.* **1980**, *185* (3), 775-777.
22. Milam, K. M.; Cleaver, J. E. *Science* **1984**, *223* (4636), 589-591.
23. Durkacz, B. W.; Omidiji, O.; Gray, D. A.; Shall, S. *Nature* **1980**, *283* (5747), 593-596.
24. Banasik, M.; Komura, H.; Shimoyama, M.; Ueda, K. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (3), 1569-1575.
25. Griffin, R. J.; Pemberton, L. C.; Rhodes, D.; Bleasdale, C.; Bowman, K.; Calvert, A. H.; Curtin, N. J.; Durkacz, B. W.; Newell, D. R.; Porteous, J. K.; et al. *Anticancer drugs* **1995**, *10* (6), 507-514.
26. López, M. d. C. A. *Anal. Quim.* **2012**, *108* (4), 290-297.

27. Ruf, A.; de Murcia, G.; Schulz, G. E. *Biochem.* **1998**, *37* (11), 3893-3900.
28. Ruf, A.; Mennissier de Murcia, J.; de Murcia, G.; Schulz, G. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93* (15), 7481-7485.
29. Ferraris, D. V. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (12), 4561-4584.
30. Virág, L.; Szabó, C. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54* (3), 375-429.
31. Curtin, N. J.; Sharma, R. A., *PARP inhibitors for cancer therapy*. 1<sup>st</sup> edition ed.; Humana Cham: Bethesda, Maryland, USA, 2015; Vol. 83.
32. Curtin, N. J. *Expert Rev. Mol. Med.* **2005**, *7* (4), 1-20.
33. Zheng, F.; Zhang, Y.; Chen, S.; Weng, X.; Rao, Y.; Fang, H. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *123*, 109661.
34. Bernstein, C.; Bernstein, H.; Payne, C. M.; Garewal, H. *Mutat. Res.* **2002**, *511* (2), 145-178.
35. Min, A.; Im, S. A. *Cancers* **2020**, *12* (2).
36. Simoneau, A.; Xiong, R.; Zou, L. *Genes Dev.* **2021**, *35* (17-18), 1271-1289.
37. Cortesi, L.; Rugo, H. S.; Jackisch, C. *Target Oncol* **2021**, *16* (3), 255-282.
38. Bryant, H. E.; Schultz, N.; Thomas, H. D.; Parker, K. M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N. J.; Helleday, T. *Nature* **2005**, *434* (7035), 913-917.
39. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C. J.; Tutt, A. N. J.; Johnson, D. A.; Richardson, T. B.; Santarosa, M.; Dillon, K. J.; Hickson, I.; Knights, C.; et al. *Nature* **2005**, *434* (7035), 917-921.
40. Montoni, A.; Robu, M.; Pouliot, E.; Shah, G. M. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 18.
41. Weigelt, B.; Comino-Méndez, I.; de Bruijn, I.; Tian, L.; Meisel, J. L.; García-Murillas, I.; Fribbens, C.; Cutts, R.; Martelotto, L. G.; Ng, C. K. Y.; et al. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23* (21), 6708-6720.



- 
42. Kondrashova, O.; Nguyen, M.; Shield-Artin, K.; Tinker, A. V.; Teng, N. N. H.; Harrell, M. I.; Kuiper, M. J.; Ho, G. Y.; Barker, H.; Jasin, M.; et al. *Cancer Discov.* **2017**, *7* (9), 984-998.
43. Kondrashova, O.; Topp, M. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 3970.
44. Ter Brugge, P.; Kristel, P.; van der Burg, E.; Boon, U.; de Maaker, M.; Lips, E.; Mulder, L.; de Ruiter, J.; Moutinho, C.; Gevensleben, H.; et al. *J.Natl. Cancer Inst.* **2016**, *108* (11).
45. Jaspers, J. E.; Kersbergen, A.; Boon, U.; Sol, W.; van Deemter, L.; Zander, S. A.; Drost, R.; Wientjens, E.; Ji, J.; Aly, A.; et al. *Cancer Discov.* **2013**, *3* (1), 68-81.
46. Aly, A.; Ganesan, S. *J. Mol. Cell Biol.* **2011**, *3* (1), 66-74.
47. Hong, R.; Ma, F.; Zhang, W.; Yu, X.; Li, Q.; Luo, Y.; Zhu, C.; Jiang, W.; Xu, B. *BMC Cancer* **2016**, *16* (1), 725.
48. Ray Chaudhuri, A.; Callen, E.; Ding, X.; Gogola, E.; Duarte, A. A.; Lee, J.-E.; Wong, N.; Lafarga, V.; Calvo, J. A.; Panzarino, N. J.; et al. *Nature* **2016**, *535* (7612), 382-387.
49. Meghani, K.; Fuchs, W.; Detappe, A.; Drané, P.; Gogola, E.; Rottenberg, S.; Jonkers, J.; Matulonis, U.; Swisher, E. M.; Konstantinopoulos, P. A.; et al. *Cell Rep.* **2018**, *23* (1), 100-111.
50. Murai, J.; Huang, S. Y.; Das, B. B.; Renaud, A.; Zhang, Y.; Doroshow, J. H.; Ji, J.; Takeda, S.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **2012**, *72* (21), 5588-5599.
51. Pettitt, S. J.; Krastev, D. B.; Brandsma, I.; Dréan, A.; Song, F.; Aleksandrov, R.; Harrell, M. I.; Menon, M.; Brough, R.; Campbell, J.; et al. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1849.
52. Vaidyanathan, A.; Sawers, L.; Gannon, A. L.; Chakravarty, P.; Scott, A. L.; Bray, S. E.; Ferguson, M. J.; Smith, G. *Br. J. Cancer* **2016**, *115* (4), 431-441.

53. Rottenberg, S.; Jaspers, J. E.; Kersbergen, A.; van der Burg, E.; Nygren, A. O.; Zander, S. A.; Derksen, P. W.; de Bruin, M.; Zevenhoven, J.; Lau, A.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (44), 17079-17084.
54. Scaiano, J. C., *Photochemistry Essentials*. ACS: 2021; p -1.
55. Turro, N. J., Organic photochemistry - an overview. In *Modern Molecular Photochemistry*, 1<sup>st</sup> edition ed.; University Science Books: Sausalito, California, 1991; pp 1-19.
56. Montalti, M.; Credi, A.; Prodi, L.; Gandolfi, M. T., *Handbook of photochemistry*. 3<sup>rd</sup> edition ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 2006.
57. Valeur, B., *Molecular fluorescence - principles and applications*. Weinheim, Germany, 2002; Vol. 1.
58. Lakowicz, J. R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> edition ed.; Springer: New York, 2006.
59. Hoffmann, N. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (3), 1052-1103.
60. Ávila-Zárraga, J. G., Síntesis fotoquímica mediante luz solar. *Educ. Química* **2009**, *20* (4), 426-432.
61. Turro, N. J.; Ramamurthy, P.; Scaiano, J. C., *Modern molecular photochemistry of organic molecules*. 2<sup>nd</sup> edition ed.; University Science Books: California, 2010.
62. Nonell, S.; Flors, C., *Singlet Oxygen - Applications in biosciences and nanosciences*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; Vol. 13.
63. Lancaster, J. R.; Martí, A. A.; López-Gejo, J.; Jockusch, S.; O'Connor, N.; Turro, N. J. *Org. Lett.* **2008**, *10* (24), 5509-5512.
64. Hurst, J. R.; Schuster, G. B. *J. Am Chem. Soc.* **1983**, *105* (18), 5756-5760.
65. Sivéry, A.; Barras, A.; Boukherroub, R.; Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Anquez, F.; Courtade, E. *J. Phys. Chem.* **2014**, *118* (5), 2885-2893.

- 
66. Krupenie, P. H., The Spectrum of Molecular Oxygen. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1972**, 1 (2), 423-534.
67. Long, C.; Kearns, D. R. *J. Chem. Phys.* **1973**, 59 (10), 5729-5736.
68. Krasnovsky, A. A., Jr.; Drozdova, N. N.; Ivanov, A. V.; Ambartsumian, R. V., *Biochem. (Mosc.)* **2003**, 68 (9), 963-6.
69. Fondriest Environmental, I. Solar radiation and photosynthetically active radiation. Disponible online . <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/weather/solar-radiation> (último acceso 08/02/2023).
70. Bylaite, M.; Grigaitiene, J.; Lapinskaite, G. S. *Br. J. Dermatol.* **2009**, 161 Suppl 3, 61-68.
71. Brian L. Diffey, I. E. K., Basic Principles of Photobiology. In *Photodermatology*, 1<sup>st</sup> edition ed.; Lim, H. W.; Honigsman, H.; Hawk, J. L. M., Eds. CRC Press: 2007.
72. Tejero, I.; González-Lafont, A.; Lluch, J. M.; Eriksson, L. A. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 398 (4), 336-342.
73. Rezende, L. G.; Tasso, T. T.; Candido, P. H. S.; Baptista, M. S. *Photochem. Photobiol.* **2022**, 98 (3), 572-590.
74. Brem, R.; Guven, M.; Karran, P. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, 107, 101-109.
75. Jackson, A. L.; Loeb, L. A. *Mutat. Res.* **2001**, 477 (1-2), 7-21.
76. Brendler-Schwaab, S.; Czich, A.; Epe, B.; Gocke, E.; Kaina, B.; Müller, L.; Pollet, D.; Utesch, D. *Mutat. Res.* **2004**, 566 (1), 65-91.
77. Epe, B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11 (1), 98-106.
78. Diffey, B. L.; Kochevar, I. E., *Basic principles of photobiology in photodermatology*. 1<sup>st</sup> edition ed.; CRC Press: USA, 2007.
79. Sierra Talamantes, C.; Zaragoza Ninet, V.; Esteve Martinez, A.; Fornés Pujalte, B.; Palomar Llatas, F. *Enferm. Dermatol.* **2015**, 9 (26), 10-19.

80. Quintero, B.; Miranda, M. A. *Ars. Pharm.* **2000**, *41* (1), 27-46.
81. Ahmad, I.; Ahmed, S.; Anwar, Z.; Sheraz, M. A.; Sikorski, M. *Int. J. Photoenergy* **2016**, *7*, 1-19.
82. Diffey, B. L. *Clin. Dermatol.* **1998**, *16* (1), 83-89.
83. Huerta Brogeras, M.; Avilés Izquierdo, J. A.; Suárez Fernández, R.; Lázaro Ochaíta, . *Semergen* **2005**, *31* (1), 10-14.
84. Fenner, J.; Clark, R. A. F., Chapter 1 - Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin. In *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Albanna, M. Z.; Holmes Iv, J. H., Eds. Academic Press: Boston, 2016; pp 1-17.
85. Slominski, A. T.; Hardeland, R.; Zmijewski, M. A.; Slominski, R. M.; Reiter, R. J.; Paus, R. *J. Invest. Dermatol.* **2018**, *138* (3), 490-499.
86. Gilaberte, Y.; Prieto-Torres, L.; Pastushenko, I.; Juarranz, Á., Chapter 1 - Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in Dermatology*, Hamblin, M. R.; Avci, P.; Prow, T. W., Eds. Academic Press: Boston, 2016; pp 1-14.
87. Charruyer, A.; Ghadially, R. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2009**, *22* (2), 55-62.
88. Graham, H. K.; Eckersley, A.; Ozols, M.; Mellody, K. T.; Sherratt, M. J., Human Skin: Composition, Structure and Visualisation Methods. In *Skin biophysics: from experimental characterisation to advanced modelling*, 1<sup>st</sup> edition ed.; Limbert, G., Ed. Springer International Publishing: Cham, 2019; pp 1-18.
89. Tobin, D. J. *J. Tissue Viability* **2017**, *26* (1), 37-46.
90. Megías M, M. P., Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. Queratinocito. Disponible online: <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html> (último acceso 14/02/2023).
91. Baron, J. M.; Höller, D.; Schiffer, R.; Frankenberg, S.; Neis, M.; Merk, H. F.; Jugert, F. K. *J. Invest. Dermatol.* **2001**, *116* (4), 541-8.

92. Baron, J. M.; Wiederholt, T.; Heise, R.; Merk, H. F.; Bickers, D. R. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15* (22), 2258-64.
93. Arda, O.; Göksügür, N.; Tüzün, Y. *Clin. Dermatol.* **2014**, *32* (1), 3-13.
94. Eckert, R. L.; Rorke, E. A. *Environ. Health Perspect.* **1989**, *80*, 109-116.
95. Madison, K. C. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *121* (2), 231-241.
96. Solano, F. *Molecules* **2020**, *25* (7).
97. Sorrell, J. M.; Caplan, A. I. *J. Cell Sci.* **2004**, *117* (Pt 5), 667-675.
98. Megías M, M. P., Pombal MA. Atlas de histología vegetal y animal. Fibroblasto. Disponible online: <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html> (último acceso 14/02/2023).
99. Chong, S. G.; Sato, S.; Kolb, M.; Gauldie, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2019**, *116*, 105595.
100. Kowalska, J.; Rok, J.; Rzepka, Z.; Wrześniok, D. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (8), 723-753.
101. Verkouteren, J. A. C.; Ramdas, K. H. R.; Wakkee, M.; Nijsten, T. *Br. J. Dermatol.* **2017**, *177* (2), 359-372.
102. Zhang, W.; Zeng, W.; Jiang, A.; He, Z.; Shen, X.; Dong, X.; Feng, J.; Lu, H. *Cancer Med.* **2021**, *10* (14), 4905-4922.
103. Stein, K. R.; Scheinfeld, N. S. *Expert Opin. Drug Saf.* **2007**, *6* (4), 431-443.
104. Drucker, A. M.; Rosen, C. F. *Drug Saf.* **2011**, *34* (10), 821-837.
105. Monteiro, A. F.; Rato, M.; Martins, C. *Clin. Dermatol.* **2016**, *34* (5), 571-581.
106. Kutlubay, Z.; Sevim, A.; Engin, B.; Tüzün, Y. *Clin. Dermatol.* **2014**, *32* (1), 73-79.
107. Murphy, G. M. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2004**, *20* (6), 305-11.

108. Gould, J. W.; Mercurio, M. G.; Elmetts, C. A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1995**, 33 (4), 551-573.
109. Montgomery, S.; Worswick, S. *Clin. Dermatol.* **2022**, 40 (1), 57-63.
110. Moore, D. E. *Drug Saf.* **2002**, 25 (5), 345-372.
111. OECD, Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2019**.
112. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br. J. Cancer* **1972**, 26 (4), 239-257.
113. Kurosaka, K.; Takahashi, M.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y. *J. Immunol.* **2003**, 171 (9), 4672-9.
114. Majtnerová, P.; Roušar, T. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, 45 (5), 1469-1478.
115. D'Arcy, M. S. *Cell Biol. Int.* **2019**, 43 (6), 582-592.
116. Rai, N. K.; Tripathi, K.; Sharma, D.; Shukla, V. K. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2005**, 4 (3), 138-44.
117. Elmore, S. *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35 (4), 495-516.
118. Trump, B. F.; Berezesky, I. K.; Chang, S. H.; Phelps, P. C. *Toxicol. Pathol.* **1997**, 25 (1), 82-8.

# **CAPÍTULO 2**

---

Objetivos



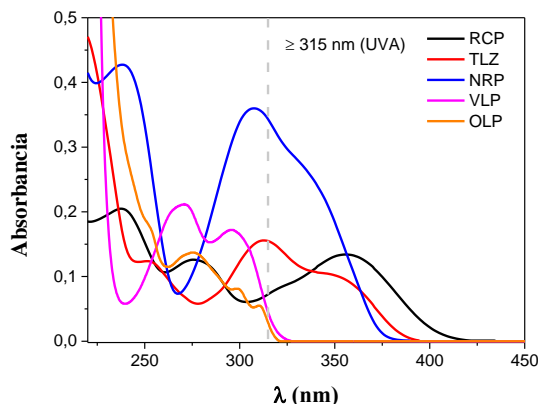


## 2.1. Hipótesis inicial.

La detección precoz del cáncer es, a día de hoy, una herramienta clave para el tratamiento contra esta enfermedad, ya que permite ofrecer un tratamiento en los primeros estadios de la enfermedad, mejorando significativamente la calidad de vida y la tasa de supervivencia de los pacientes oncológicos. En este sentido, el desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer permite actuar sobre una diana molecular específica que juega un papel crítico en el crecimiento o la progresión del tumor, que, en comparación con los agentes quimioterapéuticos convencionales, resultan ser más eficaces y menos tóxicas. Sin embargo, el uso recurrente de los fármacos empleados en terapias dirigidas conlleva la aparición de efectos adversos, como es el caso de las reacciones cutáneas fotoagravadas.

Dado que el número de casos de fotosensibilización por fármacos está en constante aumento y ante la dificultad de establecer una correlación entre la administración y la exposición a la luz solar, la presente tesis se centra en investigar si los inhibidores de la PARP (utilizados hoy en día en terapias dirigidas para el tratamiento de diversos cánceres de tumor sólidos) son capaces de inducir reacciones de fotosensibilidad.

Tras un primer cribado de los cinco inhibidores de la PARP de tercera y última generación desarrollados hasta la fecha: rucaparib, talazoparib, niraparib, olaparib y veliparib, se descartaron para este estudio olaparib y veliparib, ya que como se puede observar en el espectro de absorción (Figura 15) presentan una baja absorción en la región UVA (315 – 400 nm) del espectro electromagnético y, por tanto, difícilmente podrían inducir reacciones de fotosensibilidad. Así, el estudio *in vitro* de la fototoxicidad celular y la fotorreactividad se centrará en los que sí poseen esa capacidad (rucaparib, talazoparib y niraparib).



**Figura 15.** Espectros de absorción de los inhibidores de la PARP-1/2 de tercera generación (20  $\mu$ M en PBS): rucaparib (RCP, traza negra), talazoparib (TLZ, traza roja), niraparib (NRP, traza azul), veliparib (VLP, traza magenta) y olaparib (OLP, traza naranja).

## 2.2. Objetivos.

El estudio de esta tesis va enfocado en primer lugar a estudiar la fotorreactividad de los fármacos seleccionados (rucaparib, talazoparib y niraparib), así como de su fotofísica con el fin de detectar la generación de especies transitorias, capaces de provocar un daño celular fotosensibilizado tras su excitación con luz UVA. Posteriormente se investigará la foto(geno)toxicidad *in vitro* de estos fármacos en queratinocitos humanos y el daño inducido a las principales dianas celulares por la generación de especies reactivas de oxígeno.

En concreto, los objetivos específicos planteados para cada uno de los fármacos objeto de estudio son:

1. Investigar el fotocomportamiento de los fármacos seleccionados en disolventes acuosos, orgánicos y en medio celular.
2. Estudiar la fotodegradación de los compuestos tras irradiación UVA en estado estacionario, así como investigar la formación de posibles fotoproductos.

3. Caracterizar las especies transitorias generadas por irradiación UVA de estos PARPis.
4. Evaluar el potencial foto(geno)tóxico de los compuestos mediante los ensayos de captación de rojo neutro (NRU) y cometa.
5. Investigar la formación de especies reactivas de oxígeno, en células, las cuales pueden estar involucradas en el daño fotosensibilizado a biomoléculas.
6. Estudiar el daño fotooxidativo *in vitro* inducido a las principales dianas celulares (lípidos, proteínas y ADN).
7. Establecer el mecanismo de muerte celular inducido por estrés oxidativo tras la irradiación de los fármacos con luz UVA en células.



# **CAPÍTULO 3**

---

Materiales y métodos



### 3.1. Reactivos.

Rucaparib (RCP, CAS 283173-50-2) se adquirió de Cymit Química S.L., talazoparib (TLZ, CAS 1207456-01-6) y niraparib (NRP, CAS 1038915-60-4) se adquirieron en TargetMol, el metabolito del niraparib (N-M1, CAS 1476777-06-6) se adquirió de Quimigen S.L. Clorpromazina hidroclicorada (CPZ, CAS 69-09-0), dodecilsulfato sódico (SDS, CAS 151-21-3), 5-hidroxiclofenaco (5-OH DCF, CAS 69002-84-2) y albúmina sérica humana, esencialmente libre de ácidos grasos (ASH, CAS 70024-90-7) se adquirieron de Sigma-Aldrich. El resto de productos químicos y disolventes empleados fueron de la mayor pureza disponible en el mercado y se utilizaron sin tratamientos adicionales.

Para los cultivos celulares, los medios de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con bajo contenido en glucosa (1 g/L) y RPMI-1640 y la solución penicilina-estreptomicina ( $1 \times 10^5$  U/mL,  $1 \times 10^5$  µg/mL) fueron suministrados por Invitrogen, el suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, FBS) y la disolución tripsina-EDTA (0,25 – 0,02 %) se adquirieron en Cultek.

La solución de tampón fosfato utilizada (PBS, pH = 7,4, 0,01 M) se preparó disolviendo tabletas de PBS de Sigma-Aldrich en la cantidad adecuada de agua Milli-Q, y previamente a su uso en los experimentos celulares, se esterilizó en autoclave.

### 3.2. Sección experimental.

#### 3.2.1. Condiciones de cultivo celular.

Los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT, CLS n° 300493) fueron cultivados en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10 % FBS, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina, en un incubador a 37 °C, 100 % humedad relativa y 5 % CO<sub>2</sub>. Las divisiones celulares se realizaron dos veces por semana con ratios 1:5 y 2:5, utilizando tripsina-EDTA (0,25 – 0,02 %) para despegar las células.

Las células de cáncer de ovario humanas (A2780, ECACC n° 93112519) y su variante cisplatino resistente (A2780cis, ECACC n° 93112517) fueron cultivadas en frascos de plástico de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con 10 % FBS, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina, en un incubador a 37 °C, 100 % humedad relativa y 5 % CO<sub>2</sub>. En el caso de las células A2780cis, el medio fue suplementado además con 1 µM de cisplatino para mantener su resistencia a este compuesto.

Previamente a cada experimento, la viabilidad de los cultivos celulares fue comprobada por el ensayo de exclusión del azul de tripán<sup>1</sup>.

#### **3.2.2. Medidas espectrofotométricas.**

Todos los espectros de absorción, fluorescencia, absorción transitoria y las medidas de tiempo de vida de fluorescencia se realizaron utilizando cubetas de cuarzo de 3,5 mL de capacidad y 1 cm de paso óptico.

Los espectros de absorción ultravioleta-visible de los compuestos en disolución se registraron en un espectrofotómetro Jasco V-650 UV/vis a temperatura ambiente.

Las mediciones de fluorescencia en estado estacionario en disolución se registraron en un espectrofluorímetro Jasco FP-8500 equipado con un monocromador en el rango de longitudes de onda de 200 a 850 nm a temperatura ambiente.

Los tiempos de vida de fluorescencia se registraron en un sistema EasyLife X equipado con un compartimento de muestras y un módulo de refrigeración para el control de la temperatura (ajustado a 25 °C), una fuente de excitación LED pulsada y un detector de tiempo de vida. La longitud de onda de la fuente de excitación fue de 310 nm, con un filtro de emisión WG370.

Las medidas de fluorescencia en células se registraron en un lector de placas multipocillo Synergy H1 en placas negras de 96 pocillos con el fin de evitar el solapamiento de la fluorescencia entre pocillos. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia se determinaron utilizando la siguiente expresión:



$$\phi_F = \phi_r \cdot \frac{A_r}{A_i} \cdot \frac{I_i}{I_r} \cdot \left(\frac{n_i}{n_r}\right)^2$$

Donde  $\phi_r$  es el rendimiento cuántico de la referencia,  $A_r$  y  $A_i$  son los valores de absorbancia de la referencia y la muestra a la longitud de onda de excitación,  $I_i$  y  $I_r$  el área bajo la curva del espectro de fluorescencia de la muestra y la referencia y  $n_i$  y  $n_r$  los valores de los índices de refracción de las disoluciones de la muestra y la referencia.

Los espectros de emisión de fosforescencia se obtuvieron utilizando un espectrofluorímetro FS5 de Edinburg Instruments equipado con una lámpara de arco de xenón libre de ozono de 150 W y un módulo SC-70 con un Dewar EPR de nitrógeno líquido. Las muestras se disolvieron en etanol y su absorbancia se fijó aproximadamente a 0,40 a  $\lambda = 300$  nm. Para registrar el espectro, se introdujeron en un tubo de cuarzo de 5 mm de diámetro y se enfriaron a 77 K por inmersión en nitrógeno líquido.

Las medidas de fotólisis de destello láser (FDL) se ejecutaron con un láser pulsado Nd:YAG L52137 V LOTIS TII a la longitud de onda de 355 nm (Sp Lotis TII, Minsk, Bielorrusia), donde la duración del pulso fue de aproximadamente 10 ns con una energía de 12 mJ por pulso. El sistema de FDL estaba equipado con un láser pulsado, un monocromador Oriel 77 250 y un osciloscopio Tektronix DP04054. Finalmente, la señal de salida del osciloscopio se transfirió a un ordenador para su procesamiento. La absorbancia de las muestras se fijó a 0,30 aproximadamente a la longitud de onda de excitación ( $\lambda = 355$  nm) y el oxígeno de las muestras fue eliminado burbujeando nitrógeno durante 15 min. Las constantes de desactivación del estado excitado triplete por oxígeno ( $k_q$ ) se determinaron empleando la ecuación de Stern-Volmer.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q \cdot [O_2]$$

Donde  $\tau$  y  $\tau_0$  corresponden al tiempo de vida del triplete en ausencia o presencia del desactivador ( $O_2$ ), respectivamente.

Las medidas de oxígeno singlete ( $^1O_2$ ,  $^1\Delta_g$ ) se realizaron en el láser Nd:YAG L52137 V LOTIS TII descrito anteriormente excitando a  $\lambda = 355$  nm. La absorbancia de las muestras se ajustó aproximadamente a 0,8 a esta longitud de onda. Los experimentos se realizaron en condiciones aeróbicas y las cinéticas de desactivación se registraron a 1274 nm utilizando un detector Hamamatsu en el infrarrojo cercano operando a 800 V acoplado a un monocromador de rejilla controlado por ordenador. Los rendimientos de generación de  $^1O_2$  se calcularon partir de la siguiente ecuación:

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta}^r \cdot \frac{\alpha_r}{\alpha_i} \cdot \frac{S_e^i}{S_e^r} \cdot \frac{n_r}{n_i}$$

Donde  $\phi_{\Delta}^r$  es el rendimiento cuántico de la referencia,  $\alpha_i$  y  $\alpha_r$  los valores de los factores de corrección de absorbancia ( $\alpha = 1 - 10^A$ , A = absorbancia a  $\lambda = 355$  nm),  $S_e^i$  y  $S_e^r$  los valores de la intensidad máxima de emisión y  $n_i$  y  $n_r$  los índices de refracción de los disolventes de la muestra (i) y la referencia (r), respectivamente.

Los experimentos de absorción transitoria y de oxígeno singlete se realizaron a temperatura ambiente utilizando cubetas de cuarzo de 3,5 mL de capacidad y 1 cm de paso óptico.

### 3.2.3. Equipo de irradiación en estado estacionario.

Las irradiaciones se llevaron a cabo en un fotorreactor LCZ-4 (Luzchem, Canadá) equipado con 14 lámparas Hitachi, 6 lámparas en la parte superior y 8 en los laterales, cuyo máximo de emisión es  $\lambda_{\max} = 350$  nm (distribución gaussiana).

Las irradiaciones en disolución se realizaron en cubetas de cuarzo de 3,5 mL de capacidad y 1 cm de paso óptico.

Para los experimentos celulares *in vitro*, las exposiciones a la luz UVA se realizaron en placas de pocillos transparentes para mitigar el efecto de la radiación UVB durante los experimentos, ya que la tapa de plástico de las placas filtra toda la radiación por debajo de 310 nm. Además, las placas se mantuvieron sobre una bandeja con hielo para evitar el sobrecalentamiento durante el transcurso de la irradiación.

La dosis de irradiación se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Dosis de irradiación } \left( J/cm^2 \right) = \frac{\text{Tiempo de irradiación (min)} \cdot \text{Irradiancia } \left( mW/cm^2 \right) \cdot 60}{1000}$$

### 3.2.4. Medidas de resonancia magnética nuclear.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H), carbono (RMN-<sup>13</sup>C), DEPT y bidimensionales HSQC y HMBC se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance III de 400 MHz, utilizando como disolventes metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) y acetonitrilo deuterado (CD<sub>3</sub>CN). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento de las señales (J) se indican en hercios (Hz).

### 3.2.5. Localización celular por microscopía confocal.

Para la localización intracelular del fármaco, se sembraron queratinocitos sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos (25.000 células/pocillo). Al día siguiente, las células se incubaron en medio DMEM fresco con el fármaco investigado durante 60 min, marcador de membrana CellMask Orange Plasma (dilución 1:10.000) durante 30 min y marcador de núcleo RedDot Far-Red (dilución 1:200) durante 10 min. Posteriormente, el medio fue retirado, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con una solución de Mowiol que contenía 2,5 % de 1,4-diazobis(2,2,2-trifluoroetil)octano (DABCO) para su visualización al microscopio, donde las imágenes representativas fueron seleccionadas de al menos tres regiones diferentes de cada muestra.

Tanto la visualización de las muestras como la captura de las imágenes se realizaron utilizando un microscopio confocal Leica SP5-AOBS (Leica, Germany), usando modo secuencial. Las longitudes de onda de excitación para el compuesto diana, el marcador de membrana y el marcador de núcleo fueron 405, 543 y 662 nm, respectivamente, y las longitudes de onda de emisión fueron 480, 567 y 694 nm.

#### **3.2.6. Ensayo de fototoxicidad *in vitro*: captación de rojo neutro (NRU).**

El test de fototoxicidad se realizó de acuerdo a las directrices de la OECD 432<sup>2</sup> con dos modificaciones: (1) los ensayos fueron realizados utilizando queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) en lugar de fibroblastos de ratón BALB/c 3T3 debido a que su similitud con las células de piel humana ha sido reportada<sup>3</sup>, y (2), las irradiaciones se llevaron a cabo en medio de cultivo DMEM sin rojo neutro para evitar la absorción en la región UV por el rojo neutro.

En resumen, las células se sembraron en dos placas de 96 pocillos por cada compuesto a una densidad de 20.000 células/pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con medio de cultivo DMEM sin rojo fenol y las células se trataron con los compuestos a evaluar a ocho concentraciones crecientes, utilizando como controles negativo y positivo del ensayo el dodecilsulfato sódico (SDS, 3,13 – 1000  $\mu$ M) y la clorpromazina (CPZ, 0,625 – 500  $\mu$ M), respectivamente. Tras 1 hora de incubación, una de las placas se irradió con una dosis de irradiación UVA de 5 J/cm<sup>2</sup> en las condiciones descritas anteriormente, mientras que la otra se mantuvo en oscuridad. Inmediatamente, todas las disoluciones se reemplazaron con medio DMEM y las placas se incubaron toda la noche en incubador. Al día siguiente, se añadieron a todos los pocillos 20  $\mu$ L de una solución de rojo neutro (50  $\mu$ L/mL) y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y se extrajo el rojo neutro de los lisosomas celulares adicionando 100  $\mu$ L de un buffer de extracción (50 % agua Milli-Q, 49,5 % etanol, 0,5 % ácido acético, v:v). Seguidamente, se registraron los valores de absorbancia a 550 nm en un lector de placas multipocillo Synergy H1 para cada compuesto, y las curvas

dosis-respuesta se ajustaron por regresión no lineal para obtener los valores  $IC_{50}$  (la concentración del compuesto que genera una reducción del 50 % en la captación del rojo neutro) en condiciones de oscuridad y luz UVA con el software GraphPad Prism versión 5.03. Finalmente, los valores del factor de fotoirritación (*photoirritation factor*, PIF) se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$PIF = \frac{IC_{50}(\text{oscuridad})}{IC_{50}(\text{luz UVA})}$$

Según las directrices de la OECD, se predice que un compuesto es fototóxico si su PIF es superior a 5, probablemente fototóxico si su PIF está comprendido entre 2 y 5, y no fototóxico si su PIF es inferior a 2.

### 3.2.7. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* MTT.

La caracterización de la citotoxicidad en condiciones de oscuridad y tras irradiación UVA se realizó a través del ensayo de viabilidad celular MTT<sup>4</sup>, utilizando queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT), células humanas de cáncer de ovario (A2780) y su variante cisplatino resistente (A2780cis). Así, se sembraron células en dos placas de 96 pocillos por compuesto a diferentes densidades en función de la línea celular ( $3 \times 10^3$  células/pocillo para HaCaT y  $1 \times 10^4$  células/pocillo para A2780 y A2780cis). Al día siguiente, las células se trataron con los compuestos a evaluar a ocho concentraciones crecientes, utilizando como controles negativo y positivo del ensayo el dodecilsulfato sódico (SDS, 3,13 – 1000  $\mu\text{M}$ ) y la clorpromazina (CPZ, 0,1 – 100  $\mu\text{M}$ ), respectivamente, y se incubaron durante 1 h. Seguidamente, una placa se expuso a una dosis de irradiación de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  mientras que la otra se mantuvo en oscuridad, e inmediatamente después, todas las soluciones se reemplazaron por medio de cultivo. Al cabo de 24 h, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de una disolución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, 0,5  $\text{mg}/\text{mL}$ ) a todos los pocillos y se incubaron durante 3 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ , permitiendo la formación de formazán por actividad mitocondrial. Finalmente, se retiró cuidadosamente el medio, se solubilizaron los cristales púrpuras de formazán en 100  $\mu\text{L}$  de DMSO y se registró la absorbancia de las placas a 540 nm utilizando

un lector de placas multipocillo Synergy H1. Para cada compuesto, se establecieron curvas de dosis-respuesta mediante regresión no lineal con el software GraphPad 5.0, lo que permitió calcular los valores de IC<sub>50</sub> (concentración de compuesto que causa un 50 % de reducción en la formación del producto formazán) en condiciones de oscuridad y luz UVA.

### **3.2.8. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Para evaluar la fototoxicidad inducida por estrés oxidativo, se midió la cantidad de ROS producida por los fármacos tras la irradiación UVA utilizando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA), una sonda profluorescente que, tras penetrar la membrana celular, es desacetilada por las esterasas intracelulares, formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF), y posteriormente oxidada por ROS para producir 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un compuesto que sí es fluorescente<sup>5</sup>.

Para este fin, los queratinocitos se sembraron en dos placas de 12 pocillos (40.000 células/pocillo). Tras 24 horas de incubación, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM sin rojo fenol que contenía el fármaco objeto de estudio y se incubó durante 1 hora. A continuación, se irradió una placa a una dosis UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras que la otra se mantuvo en oscuridad. Posteriormente, el medio se reemplazó con una solución de H<sub>2</sub>DCF-DA 25 μM en PBS y se incubó durante 30 min en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 4000B ( $\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ ) empleando un filtro de fluoresceína FITC. Para cada condición, se seleccionaron imágenes representativas de dos pocillos aleatorios en diferentes regiones de cada condición.

### **3.2.9. Fotoperoxidación lipídica.**

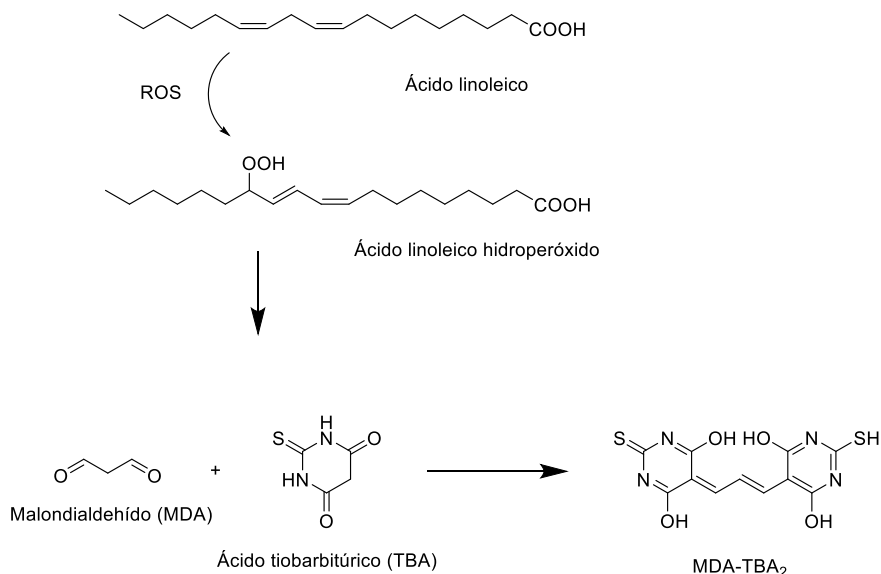
La oxidación de lípidos afecta fundamentalmente a los ácidos grasos poliinsaturados (*Poly Unsaturated Fatty Acids*, PUFAs), ya que poseen un sistema de dobles enlaces conjugados que estabiliza los intermedios de oxidación. Como

resultado, se obtiene una mezcla compleja de diferentes productos, incluyendo radicales peroxilo lipídicos e hidroperóxidos como productos principales, así como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE) y F<sub>2</sub>-isoprostanos como productos secundarios<sup>6</sup>. Estos últimos son conocidos como biomarcadores de la peroxidación lipídica y su cuantificación permite estimar la fotoperoxidación lipídica por acción de un fotosensibilizante<sup>7, 8</sup>.

Mecanísticamente, la acción oxidante de las ROS provoca la oxidación lipídica mayoritaria de las PUFAs, dando lugar a la formación de hidroperóxidos cuya acumulación sistemática puede generar reacciones de ciclación o la fragmentación de la cadena, liberando los productos de oxidación secundarios mencionados anteriormente (MDA, HNE, etc.)<sup>9</sup>.

A nivel celular, el ácido linoleico (y sus derivados ésteres) son uno de los principales ácidos grasos de las membranas lipídicas y de las lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoprotein*, LDL), por lo que estos lípidos son los objetivos principales de la peroxidación lipídica<sup>10</sup>.

Uno de los métodos más utilizados para la identificación de la peroxidación lipídica es el método TBARS (*tiobarbituric acid reactive substances*), una técnica basada en la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos MDA-TBA<sub>2</sub>, un conjugado que absorbe en el espectro visible a 532 nm y que presenta un color rosado característico<sup>6, 11</sup> (Figura 16). Cabe destacar que el MDA no es el único subproducto capaz de reaccionar con el TBA, pudiéndose obtener la formación de otros aductos que modifican el color característico del aducto MDA-TBS<sub>2</sub><sup>6</sup>.



**Figura 16.** Reacción de formación de TBARS a partir de ácido linoleico.

La peroxidación lipídica fotoinducida se evaluó indirectamente mediante el método de cuantificación de reactivos del ácido tiobarbitúrico (método TBARS), utilizando ácido linoleico (AL) como sustrato para determinar el potencial de fotoperoxidación lipídica de los fármacos.

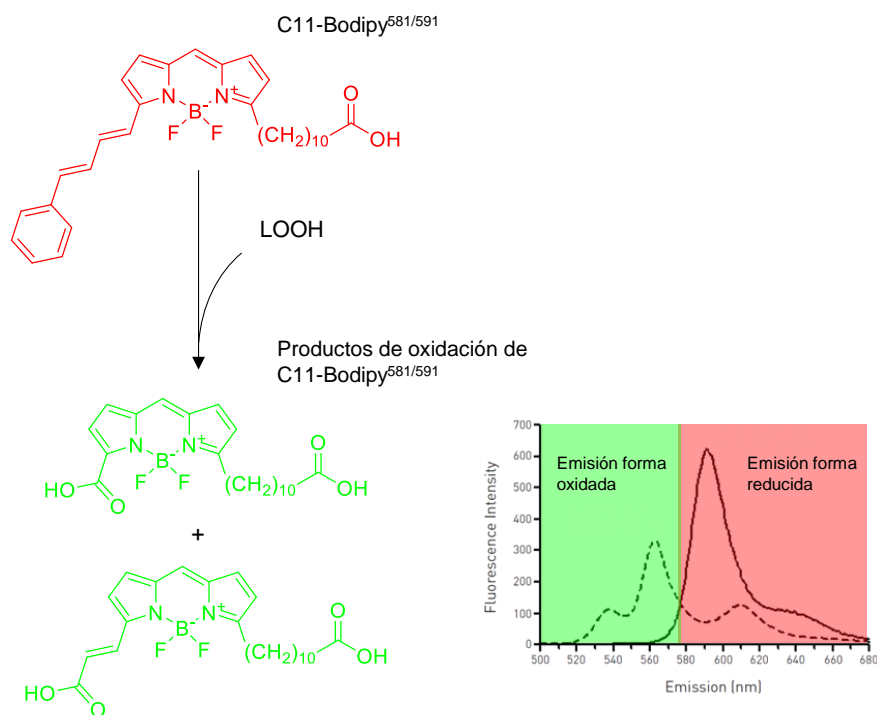
Previamente, para la cuantificación de los valores de TBARS finales, se preparó una recta patrón de malondialdehído (MDA) a partir de diluciones de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP, 1 mM en ácido acético) en agua MiliQ (0, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{M}$ ) y se trataron con ácido tiobarbitúrico (TBA) al mismo tiempo que las muestras a ensayar.

Se prepararon disoluciones de AL 1 mM en PBS (20 mM) con tensioactivo Tween 20 al 0.05 %, se incubaron con cantidades crecientes del fármaco a estudiar o con el control positivo ketoprofeno (KP, 100  $\mu\text{M}$ ) y se irradiaron con cantidades crecientes de dosis de irradiación UVA (0, 5, 10, 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Inmediatamente, todas las muestras se fueron tratando conforme finalizaba la irradiación con 10  $\mu\text{L}$  de butilhidroxitolueno (BHT) al 1 % (p/v) en ácido acético, evitándose así oxidaciones posteriores. Acto seguido, las muestras (y las diluciones de la recta patrón) se



trataron con TBA (500  $\mu$ L, 4 mM) y se incubaron a 95  $^{\circ}$ C durante 1 h en oscuridad, permitiendo la formación de los aductos MDA-TBA<sub>2</sub>. Seguidamente, se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos y se registró la absorbancia a 532 nm utilizando el lector de placas multipocillo Synergy H1. Finalmente, los valores de TBARS ( $\mu$ M) se calcularon mediante interpolación de los valores obtenidos con la recta patrón.

Por otro lado, la fotoperoxidación de lípidos en células se evaluó utilizando el ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanoico, también conocido como C11-Bodipy<sup>581/591</sup>, una sonda molecular capaz de penetrar la membrana plasmática y cuya fluorescencia cambia de rojo ( $\lambda_{exc}$  = 535 nm,  $\lambda_{em}$  = 590 nm) a verde ( $\lambda_{exc}$  = 490 nm,  $\lambda_{em}$  = 510 nm) cuando la molécula es oxidada<sup>12, 13</sup> (Figura 17).



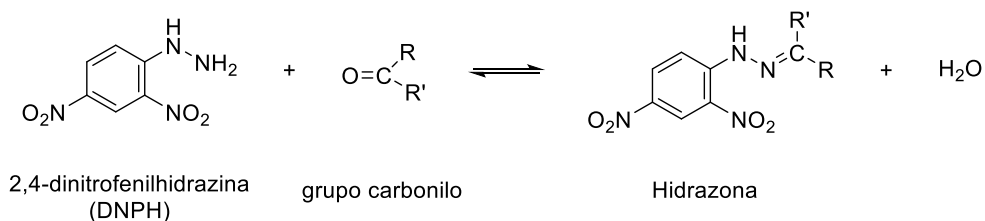
**Figura 17.** Reacción de oxidación del C11-Bodipy<sup>581/591</sup> (LOOH = lípido hidroperóxido).

En resumen, los queratinocitos se sembraron en dos placas de 24 pocillos a una densidad de 60.000 células/pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol, evitándose así la absorción de la radiación UVA por este compuesto, y las células fueron tratadas con el fármaco en estudio e incubadas durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se irradió una placa con una dosis de irradiación de 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras la otra se mantuvo en condiciones de oscuridad, e inmediatamente todas las células se marcaron con el sensor de peroxidación lipídica C11-Bodipy<sup>581/591</sup> (10 μM) durante 30 min a 37 °C en oscuridad. Finalmente, las imágenes de fluorescencia de los cultivos se adquirieron con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 4000B en modo secuencial para detectar tanto la forma no oxidada (fluorescencia roja, λ<sub>exc</sub> = 535 nm, λ<sub>em</sub> = 590 nm) como la oxidada (fluorescencia verde, λ<sub>exc</sub> = 490 nm, λ<sub>em</sub> = 510 nm) de la sonda. Para cada condición, se seleccionaron imágenes representativas en diferentes regiones de cada condición.

#### **3.2.10. Fotooxidación de proteínas.**

La modificación oxidativa de la estructura de las proteínas abarca una amplia variedad de reacciones, como la nitración de residuos de tirosina, la carbonilación, la oxidación de metionina o grupos tiol, etc<sup>7, 14</sup>. En comparación con otros cambios oxidativos, la carbonilación de proteínas es la modificación oxidativa más frecuente y normalmente irreversible que afecta a proteínas y da lugar a compuestos estables<sup>15</sup>. Así, este proceso consiste en la introducción de grupos carbonilo, principalmente aldehídos y cetonas, en la estructura proteica a través de diversos mecanismos, tales como: (1) oxidación directa de residuos de aminoácidos (arginina, lisina, prolina y treonina) por radicales hidroxilos, (2) interacción con productos resultantes de la peroxidación lipídica con grupos aldehído, o (3) interacción con grupos carbonilo resultantes de degradación de lípidos o de reacciones de glicación o glicosilación<sup>7</sup>. La cuantificación y detección de carbonilos de proteínas (*protein carbonyl*, PCO) en muestras biológicas es una forma indirecta de determinar el nivel de estrés oxidativo, ya que representa un marcador irreversible de oxidación de proteínas.

En la actualidad, aunque existen diversos métodos para la evaluación del contenido de PCO (inmunoquímica, ELISA y Western blot, etc.), entre ellos, el más empleado es la derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), una técnica basada en la reacción de la DNPH con grupos carbonilo que conduce a la formación de 2,4-dinitrofenilhidrazona (Figura 18). El grupo dinitrofenilo se caracteriza por presentar un espectro de absorción con un máximo entre 365 – 375 nm, por lo que se puede detectar y cuantificar espectrofotométricamente<sup>15</sup>.



**Figura 18.** Reacción de la DNPH con grupos carbonilos por condensación.

Así, la detección de la formación de proteínas carboniladas fotoinducidas se evaluó mediante el ensayo de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)<sup>15</sup> con ligeras modificaciones, utilizando albúmina sérica humana (ASH) como modelo de proteína.

En resumen, se prepararon disoluciones de ASH (5 mg/mL) en PBS, se incubaron con cantidades crecientes del fármaco a estudiar a temperatura ambiente durante 1 hora y se irradiaron con cantidades crecientes de dosis de irradiación UVA (0, 5, 10, 15 J/cm<sup>2</sup>). Inmediatamente después, las muestras se trataron con DNPH (200 µL, 10 mM) y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir la formación de los aductos de dinitrofenilhidrazona. Seguidamente, las proteínas se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético (TCA, 1 mL, 20 % v:v), se incubaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 min. A continuación, tras descartar los sobrenadantes, los precipitados se lavaron dos veces añadiendo una solución de etanol/acetato de etilo (1 mL, 50:50, v:v) con TCA al 20 % para eliminar el DNPH que no reaccionó, y se secaron a 60 °C durante 15 min para evaporar completamente el solvente. Finalmente, los

aductos se disolvieron en clorhidrato de guanidina (100  $\mu\text{L}$ , 6 M) durante toda la noche a 4  $^{\circ}\text{C}$  y se registró la absorbancia a 375 nm utilizando el lector de placas multipocillo Synergy H1. El grado de oxidación de ASH se expresó como nmol de contenido de carbonilo por mg de proteína de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido carbonílico (nmol/mg proteína)} = \frac{(A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}) \cdot 100}{6,364}$$

Donde el valor de 6,364 corresponde a la multiplicación del valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a  $\lambda = 375$  nm por la longitud del paso óptico (l) en una placa de 96 pocillos ( $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0,2893 \text{ cm}$ ), y el valor de 100 corresponde al volumen de la muestra (100  $\mu\text{L}$ ).

### 3.2.11. Fotogenotoxicidad.

Como se ha mencionado anteriormente (véase apartado 1.4.1.), los diversos tipos de daño inducido al ADN por fotosensibilizadores pueden ocasionar en última instancia lesiones físicas en las hebras de ADN, generando rupturas que pueden ir de menor a mayor impacto en función del grado de fragmentación del ADN, desde rupturas de cadena simple y de cadena doble (forma II) y finalmente la fragmentación total del ADN (forma III).

Una de las metodologías ampliamente investigada y desarrollada para la detección de roturas de cadena del ADN genómico es la electrofóresis de células individuales o ensayo cometa (*single cell gel electrophoresis assay – comet assay*)<sup>16</sup>, una técnica versátil capaz de medir las roturas SSB y DSB de células individuales en condiciones alcalinas tras la exposición simultánea de células a radiación UV/vis y un agente fotosensibilizante. Así, el ADN dañado muestra una mayor migración en la electrofóresis desde el núcleo hacia el ánodo, asemejándose a la forma de un cometa<sup>17-19</sup>.

A pesar de la gran utilidad de esta técnica, no permite determinar qué fotoproducto en particular ha sido el causante de dichas rupturas. Es por ello que han ido surgiendo modificaciones con el fin de aumentar la sensibilidad, reproducibilidad y

aplicabilidad del ensayo. En este contexto, la técnica habitual para la caracterización de las modificaciones al ADN es la electroforesis en gel de agarosa del plásmido de la *Escherichia coli* (*E. Coli*) pBR322, incluyendo el uso de enzimas de reparación con actividad glicosilada/endonucleasa específica para la detección de un amplio rango de lesiones en el ADN<sup>20</sup>. Las enzimas más empleadas son la endonucleasa III (Endo III), para la detección de bases pirimidínicas oxidadas,<sup>21</sup> la T4endonucleasa V (T4endoV o Endo V), para la detección de dímeros de timina ciclobutano (CPDs)<sup>22</sup>, y la ADN-formamidopirimidina glicosidasa (FPG) para la detección de purinas oxidadas<sup>23</sup>.

#### *Daño fotosensibilizado al ADN plasmídico.*

Se prepararon muestras que contenían 250 ng/μL de ADN circular superenrollado (pBR322, 4361 pares de bases) en presencia o ausencia del compuesto objeto de estudio en PBS y se irradiaron con una dosis de luz UVA de 15 J/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, para caracterizar las modificaciones químicas promovidas por los compuestos, las muestras se digirieron tras la irradiación con un exceso de endonucleasa III (Endo III), endonucleasa V (Endo V) o formamidopirimidina (FPG), 0,5 U a 37 °C durante 1 h. Inmediatamente, se añadió un tampón de carga (0,25 % azul de bromofenol y 30 % de glicerol en agua) a cada muestra y se cargaron en un gel de agarosa al 0,8 % que contenía SYBR® Safe como marcador de ácidos nucleicos. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis en un tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM) a 100 V durante 1 h. Finalmente, las bandas de ADN se visualizaron con el sistema de imágenes Gel Logic 200 (Kodak) y la densitometría se cuantificó con el software ImageJ, calculándose para cada condición el porcentaje relativo de la forma relajada dañada (Forma II) del plásmido pBR322 con respecto a la forma inicial superenrollada (Forma I).

#### *Ensayo cometa.*

El conocido ensayo de electroforesis de células individuales o ensayo cometa se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito en la bibliografía<sup>24</sup> con ligeras modificaciones, utilizando queratinocitos humanos (HaCaT) en lugar de fibroblastos

humanos (FSK). Las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en PBS e incubadas a 4 °C durante 2 horas para permitir que los queratinocitos repararan el daño basal al ADN generado por haber despegado con tripsina. Seguidamente, las células se sembraron en dos placas de 24 pocillos (50.000 células/pocillo), se trataron con el fármaco objeto de estudio o con el control positivo (CPZ, 5  $\mu$ M) y se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad. Posteriormente, una placa se expuso a una dosis de irradiación UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras que la otra se mantuvo en condiciones de oscuridad como control negativo. Acto seguido, se mezclaron 100  $\mu$ L de cada suspensión celular con 100  $\mu$ L de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 1 %, se vertieron las gotas en portaobjetos Trevigen pretratados y se colocaron en una bandeja a 4 °C para permitir que gelificaran. Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en frascos llenos de un tampón previamente enfriado de lisis celular (NaCl 2,5 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 M, Tris 0,01 M, Tritón X-100 al 1 %, en agua destilada y pH 10) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche para permitir la lisis celular.

Al día siguiente, se realizó la electrofóresis a 21 V ( $\approx$  300 mA) durante 30 min a 4 °C en un tanque de electrofóresis Trevigen para ensayo cometa, cargado con todos los portaobjetos y cubierto de 1 L de tampón de electrofóresis alcalino enfriado (NaOH 0,2 M, EDTA 1 mM, en agua destilada). Trascorrida la electrofóresis, los portaobjetos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos y el ADN se fijó mediante dos subsiguientes incubaciones con disoluciones de etanol al 70 % y 100 % durante 5 minutos cada una, y secadas en una estufa a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, los nucleoides y las colas de ADN se tiñeron con SYBR® Gold [dilución 1:10.000 en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM)] durante 30 min a 4°C en oscuridad, lavados una vez con agua Milli-Q, secados al aire y almacenados en oscuridad hasta su visualización. Finalmente, los nucleoides y las colas de ADN se visualizaron utilizando un microscopio Leica DMI 4000B ( $\lambda_{exc}$  = 490 nm,  $\lambda_{em}$  = 537 nm), escogiendo 5 imágenes por condición. El porcentaje de daño al ADN en cada muestra se determinó mediante el recuento manual de al menos 100 cometas de ADN, con la ayuda del software ImageJ 1.52, y el daño total

en el ADN se estableció mediante su clasificación en seis categorías de daño al ADN<sup>25</sup> de acuerdo con la siguiente ecuación, donde los cometas de clase 0 no muestran daño y los de clase 6 indican el máximo daño al ADN.

$$\text{Daño al ADN (\%)} = \frac{\sum_{n=0}^6 n^{\circ} \text{ de cometas de clase } n \cdot n}{6}$$

Para determinar si las células eran capaces de reparar el daño al ADN promovido por los compuestos junto a la irradiación UVA, se realizaron experimentos de recuperación. Así, previo a la lisis celular, los portaobjetos se mantuvieron en medio de cultivo DMEM no suplementado a 37 °C durante 6 horas para, posteriormente, lisarse siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para este propósito, se utilizó el 5-hidroxiclofenaco (5-OH DCF, 100 µM) como control positivo de recuperación<sup>26</sup>.

### 3.2.12. Mecanismos de muerte celular.

La medición de los componentes citoplasmáticos liberados al medio de cultivo es uno de los métodos más conocidos y ampliamente reconocidos para estimar la viabilidad celular. En concreto, una de esas técnicas para evaluar la necrosis se basa en la detección de la enzima L-lactato deshidrogenasa (LDH), ya que se trata de una enzima citoplasmática que es liberada al medio extracelular al producirse un daño en la membrana plasmática capaz de provocar desde su permeabilización hasta su ruptura<sup>27</sup>. Una vez liberada, la actividad enzimática de la LDH puede evaluarse mediante ensayos enzimáticos acoplados utilizando sustratos profluorescentes, como es el caso de la resazurina, un indicador redox no fluorescente que es reducido por el entorno celular a resorufina, que sí es fluorescente<sup>28</sup>.

Por otro lado, Dado que la apoptosis se produce a través de una extensa y compleja cascada de señalización, existen una gran variedad de técnicas para evaluar la apoptosis celular. Uno de ellos, consiste en la detección de caspasas por lisis celular para liberar las enzimas en una solución que contenga un sustrato profluorescente.

Esta técnica permite tanto una selección concreta de caspasas iniciadoras o ejecutoras como una cuantificación rápida y consistente de la apoptosis, con el gran inconveniente de destruir la integridad de la muestra en el proceso<sup>29, 30</sup>.

#### *Ensayo de apoptosis celular.*

Los queratinocitos se sembraron en dos placas de 96 pocillos con una densidad de 20.000 células/pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol y las células fueron tratadas con el fármaco objeto de estudio e incubadas durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se irradió una placa con una dosis de irradiación UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras la otra se mantuvo en condiciones de oscuridad, e inmediatamente todas las soluciones fueron reemplazadas por DMEM y las placas se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se añadió 100 µL de sustrato caspasa-3/7 (amida ácida bis-N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-aspartico, Z-DEVD-R110), diluido en un tampón homogéneo Apo-one Caspasa-3/7 (R&D Systems), y se incubó durante 4 horas. Finalmente, la fluorescencia de la rodamina 110 liberada por la actividad de la caspasa se monitorizó utilizando un lector de placas Synergy H1 en placas negras de 96 pocillos ( $\lambda_{exc} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 528 \text{ nm}$ ).

#### *Ensayo de necrosis celular.*

Los queratinocitos se sembraron en dos placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células/pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin rojo fenol y las células fueron tratadas con el fármaco objeto de estudio e incubadas durante 1 hora en oscuridad. A continuación, se irradió una placa con una dosis de irradiación UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>, mientras la otra se mantuvo en condiciones de oscuridad, e inmediatamente todas las soluciones fueron reemplazadas por DMEM y las placas se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadió 100 µL de sustrato de la LDH (resazurina) diluido en un tampón homogéneo CytoTox-ONE™ Reagent (Promega) a todos los pocillos a excepción del control positivo, al cual se adicionaron en su lugar 2 µL de una disolución de Tritón X-100 al 9 % en tampón de



lisis CytoTox-ONE™ Lysis solution (Promega). Se incubó durante 10 minutos a 22 °C y se añadió 50 µL de una disolución de CytoTox-ONE™ Stop solution (Promega) para frenar la reacción enzimática. Finalmente, la fluorescencia de la resorufina se monitorizó utilizando un lector de placas Synergy H1 en placas negras de 96 pocillos ( $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ ). El porcentaje de LDH liberada en cada muestra se determinó mediante la relación de los valores de fluorescencia de la resorufina registradas entre la muestra y el control positivo de acuerdo a la siguiente expresión:

$$LDH \text{ liberada } (\%) = \frac{(F_m - F_b)}{(F_{max} - F_b)} \cdot 100$$

Donde  $F_m$  corresponde a la fluorescencia de la muestra,  $F_b$  a la fluorescencia residual del medio de cultivo y  $F_{max}$  a la fluorescencia del control positivo, el cual es tomado como el valor máximo de LDH liberada.

### 3.2.13. Análisis de datos y estadística.

Las estructuras químicas fueron representadas utilizando el software ChemDraw versión 18.1. Los espectros de absorción, fluorescencia y fotólisis de destello láser se representaron utilizando el software OriginPro versión 9.0. Los espectros de RMN se representaron y analizaron utilizando el software MestReNova versión 6.0.2. La intensidad de fluorescencia de los geles de agarosa se cuantificó mediante densitometría utilizando el software ImageJ versión 1.52. El análisis de los resultados *in vitro* y los métodos de regresión se desarrollaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.03. Los resultados obtenidos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (s) de al menos tres experimentos independientes. El nivel de significación estadística se determinó a partir del test t-Student, considerando únicamente valores de  $p$  inferiores a 0,05 como resultados significativos (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 3.3. Bibliografía.

1. Strober, W. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, 111, A3.B.1-a3.B.3.
2. OECD, Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2019**.
3. Svobodová, A. R.; Ultichová, J.; Vostálová, J. *An. Bras. Dermatol.* **2019**, 94 (1), 105-106.
4. Präbst, K; et al. *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1601, 1-17.
5. Wang, X.; Roper, M. G. *Anal. Methods* **2014**, 6 (9), 3019-3024.
6. Aguilar Diaz De Leon, J.; Borges, C. R. *J. Vis. Exp.* **2020**, (159).
7. Purdel, C. *Annu. Res. Rev. Biol.* **2014**, 4, 2015-2026.
8. Tsikas, D. *Anal. Biochem.* **2017**, 524, 13-30.
9. Frankel, E. N., Chapter 3 - Photooxidation of unsaturated fats. In *Lipid Oxidation*, 2nd edition ed.; Frankel, E. N., Ed. Woodhead Publishing: 2012; pp 51-66.
10. Tejero, I.; González-Lafont, A.; Lluch, J. M.; Eriksson, L. A. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 398 (4), 336-342.
11. Onoue, S.; Tsuda, Y. *Pharm. Res.* **2006**, 23 (1), 156-64.
12. Pap, E. H. W.; Drummen, G. P. C.; Winter, V. J.; Kooij, T. W. A.; Rijken, P.; Wirtz, K. W. A.; et. al. *FEBS Lett.* **1999**, 453 (3), 278-282.
13. Bacellar, I. O. L.; Baptista, M. S. *ACS Omega* **2019**, 4 (26), 21636-21646.
14. Brem, R.; Guven, M.; Karran, P. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, 107, 101-109.
15. Colombo, G.; Clerici, M.; Garavaglia, M. E.; Giustarini, D.; Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. *J. Chromatogr. B.* **2016**, 1019, 178-190.
16. Ostling, O.; Johanson, K. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 123 (1), 291-8.

17. Collins, A. R. *Mol. Biotechnol.* **2004**, 26 (3), 249-61.
18. Olive, P. L.; Banáth, J. P. *Nat. Protoc.* **2006**, 1 (1), 23-29.
19. Speit, G.; Hartmann, A., The Comet Assay. A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In *DNA Repair Protocols: Mammalian Systems*, 2nd edition ed.; Henderson, D. S., Ed. Humana Press: Totowa, NJ, 2006; pp 275-286.
20. Epe, B. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11 (1), 98-106.
21. Collins, A. R.; Duthie, S. J.; Dobson, V. L. *Carcinogenesis* **1993**, 14 (9), 1733-5.
22. Bjelland, S.; Seeberg, E. *Mutat. Res.* **2003**, 531 (1-2), 37-80.
23. Dušinská, M.; Collins, A. *ATLA* **1996**, 24 (3), 405-411.
24. Palumbo, F.; Garcia-Lainez, G.; Limones-Herrero, D.; Coloma, M. D.; Escobar, J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, 313, 131-137.
25. Møller, P. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2006**, 612 (2), 84-104.
26. Garcia-Lainez, G.; Martínez-Reig, A. M.; Limones-Herrero, D.; Consuelo Jiménez, M.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, 341, 51-55.
27. Chan, F. K.; Moriwaki, K.; De Rosa, M. J. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 979, 65-70.
28. Lavogina, D.; Lust, H.; Tahk, M. J.; Laasfeld, T.; Vellama, H.; Nasirova, N.; Vardja, M.; Eskla, K. L.; Salumets, A.; Rincken, A.; Jaal, J. *Biosensors* **2022**, 12 (4).
29. Elmore, S. *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35 (4), 495-516.
30. Choudhary, G. S.; Al-Harbi, S.; Almasan, A. *Methods Mol. Biol.* **2015**, 1219, 1-9.



# CAPÍTULO 4

---

Rucaparib



## 4.1. Introducción.

Como se ha indicado en la introducción general (véase apartado 1.1), el cáncer es una de las enfermedades más prevalentes, siendo la segunda causa de muerte a nivel mundial. Entre los tratamientos actualmente disponibles para esta patología, la quimioterapia ha sido el mayor avance farmacológico de las últimas décadas. Sin embargo, los fármacos utilizados para este fin tienen un estrecho índice terapéutico y, a menudo, su respuesta es paliativa. Por el contrario, las terapias dirigidas introducidas recientemente inhiben una diana molecular específica, generalmente una proteína con un papel crucial en el crecimiento o la progresión tumoral, limitando así los efectos secundarios tóxicos.

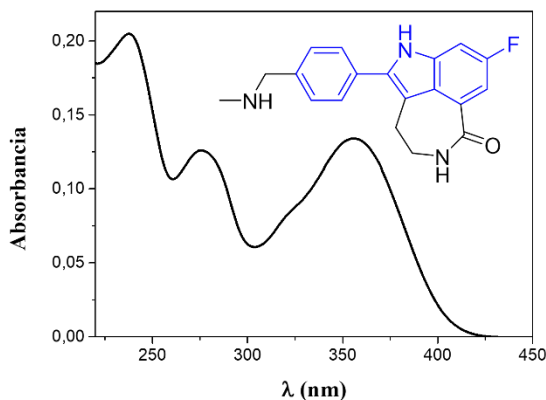
En este contexto, los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARPs) han surgido como prometedores terapias antitumorales dirigidas<sup>1, 2</sup>. Los PARPs son una gran familia de enzimas multifuncionales que catalizan la transferencia de ADP-ribosa a proteínas diana. Estas enzimas están involucradas en procesos celulares como la modulación de la estructura de la cromatina, transcripción, replicación, recombinación y reparación al ADN<sup>3</sup>. Las PARPs más abundantes (PARP-1 y PARP-2) desempeñan un papel esencial en la reparación de roturas de cadena simple (SSB) del ADN a través de la ruta de reparación por escisión de bases (BER)<sup>4</sup>, ya que una eficiente reparación de SSB es esencial para la supervivencia celular. Así, la inhibición de la PARP-1 genera una acumulación de SSB sin reparar, lo que conduce a un colapso en las horquillas de replicación, provocando la generación de roturas de cadena doble (DSB), que son tóxicas para las células y deben repararse por la vía de reparación de la recombinación homóloga (RH), en la que los genes *BRCA1* y *BRCA2* son elementos clave para su activación<sup>5</sup>. Por tanto, la inhibición de las enzimas PARPs es una estrategia terapéutica potencialmente letal que consiste en provocar inestabilidad cromosómica, detención del ciclo celular, y posterior apoptosis que parece ser atribuible a la persistencia de lesiones en el ADN que normalmente son reparados por recombinación homóloga<sup>4, 6</sup>.

Rucaparib (RCP) es un potente inhibidor selectivo de PARP-1 y PARP-2 que induce letalidad sintética en células cancerosas incapaces de reparar el daño al ADN por la vía RH. Este fármaco fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA) en 2016 para el tratamiento de tumores de cáncer de ovario que albergan mutaciones germinales y/o somáticas en los genes *BRCA*<sup>7-11</sup> y, recientemente, también ha sido aprobado por la FDA en 2020 para el tratamiento de pacientes con mutaciones *BRCA* dañinas asociadas con el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (*metastatic castrate-resistant prostate cancer*, mCRPC)<sup>12</sup>.

En general, aunque los pacientes toleran bien el RCP, se han descrito algunos efectos secundarios tales como fatiga, mareos, trastornos gastrointestinales, trombocitopenia, neutropenia, prurito y sensibilidad de la piel a la radiación solar<sup>13</sup>. Con estos antecedentes, el presente trabajo tiene como objetivo investigar el daño fotoinducido generado a dianas bioquímicas en las células vivas, utilizando una metodología previamente desarrollada en nuestro grupo de investigación para estudiar las reacciones de fotosensibilidad inducidas por fármacos y sus metabolitos<sup>14-18</sup>.

Desde un punto de vista fotobiológico, aunque el RCP presenta un grupo cromóforo indólico en su estructura química, muestra un desplazamiento batocrómico de la banda de absorción hacia la región UVA del espectro electromagnético, pudiendo inducir de esta forma reacciones de fotosensibilidad con luz solar (Figura 19). Por consiguiente, parece necesario investigar las reacciones de foto(geno)toxicidad inducidas por RCP, contribuyendo así a mejorar la comprensión de estos fenómenos de fotosensibilidad. Estos resultados ayudarán a asesorar y alertar de los efectos indeseados de este fármaco en pacientes oncológicos con el fin de evitar estos riesgos fotobiológicos.





**Figura 19.** Espectro de absorción del rucaparib 20  $\mu\text{M}$  en PBS. Figura insertada: estructura química del rucaparib.

## 4.2. Sección experimental.

Las condiciones de cultivo celular y las medidas espectroscópicas se realizaron de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 3.

### 4.2.1. Irradiación en estado estacionario y aislamiento del fotoproducto.

La irradiación del RCP (20 mg, 1 mg/mL) se llevó a cabo en metanol en tubos Pyrex a temperatura ambiente durante 150 min. A continuación, se eliminó el disolvente por evaporación a presión reducida y el crudo de irradiación resultante se purificó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa (C18 mediterranea™ sea, 25  $\times$  1 cm), una fase móvil de acetonitrilo-agua 50:50 v:v con ácido tricloroacético al 0,1 % y un flujo de 2 mL/min. El proceso de purificación fue monitorizado por detección UV a 254 nm.

El fotoproducto resultante aislado por HPLC se caracterizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  en un espectrómetro Bruker Advance 400 y por espectrometría de masas de alta resolución [HRMS (ESI-TOF), espectrómetro QTOF acoplado a una columna UPLC BEH C18 (50 mm,  $\times$  2,1 mm i.d., 1,7  $\mu\text{M}$ ), fuente ESI en ionización positiva a 1,9 kV].

4-(8-fluoro-1-oxo-2,3,4,6-tetrahidro-1H-azepino[5,4,3-cd]indol-5-yl)benzaldehido:  
RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 10.07 (s, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.59 (dd, *J* = 10.7, 2.2 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.60 - 3.59 (m, 2H), 3.27 – 3.21 (m, 2H) ppm; RMN-<sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) δ 193.58, 159.91, 139.22, 136.75, 131.26, 131.19, 129.46, 127.65, 124.77, 115.36, 112.04, 111.78, 102.59, 102,33, 43.68, 30.14 ppm. HRMS (ESI-TOF): *m/z* calculada para C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>F [MH<sup>+</sup>] 309,1028, encontrada [MH<sup>+</sup>] 309,1039.

#### 4.2.2. Localización celular por microscopía confocal.

La localización intracelular del RCP se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con RCP 20 μM.

#### 4.2.3. Ensayo de fototoxicidad *in vitro*: captación de rojo neutro (NRU).

El ensayo de captación de rojo neutro se llevó a cabo tal y como se describió en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con ocho concentraciones crecientes de RCP, que oscilaban entre 2,5 y 500 μM, o con los controles positivo (CPZ) y negativo (SDS) e irradiadas con una dosis UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>.

#### 4.2.4. Ensayo de fotoperoxidación lipídica.

El estudio de la fotoperoxidación lipídica se realizó de acuerdo con el protocolo detallado en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con RCP (50 μM) o con el control positivo (KP, 100 μM) e irradiadas con una dosis UVA de 15 J/cm<sup>2</sup>.

#### 4.2.5. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La detección de las ROS se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con RCP (0, 2, 5 o 10 μM) e irradiadas con una dosis UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>.

#### **4.2.6. Fotooxidación de proteínas.**

El estudio de la formación de proteínas carboniladas se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 3, donde las disoluciones de ASH se incubaron con cantidades crecientes de RCP (0, 5, 10, 40 o 50  $\mu\text{M}$ ) y se irradiaron con cantidades crecientes de dosis de irradiación UVA (0, 5, 10, 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ )

#### **4.2.7. Daño fotoinducido al ADN: ensayo cometa.**

El ensayo cometa se realizó siguiendo las pautas detalladas en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con cantidades crecientes de RCP (0, 2, 5, 10 o 50  $\mu\text{M}$ ) o con el control positivo (CPZ, 5  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis de irradiación de 2 o 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Para los experimentos de recuperación, se utilizó el 5-hidroxiclofenaco (5-OH DCF, 100  $\mu\text{M}$ ) como control positivo<sup>17</sup>.

#### **4.2.8. Ensayo de activación de la caspasa-3/7.**

El ensayo de activación de la caspasa-3/7 se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con RCP (0, 0,25, 1 o 3  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis UVA de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

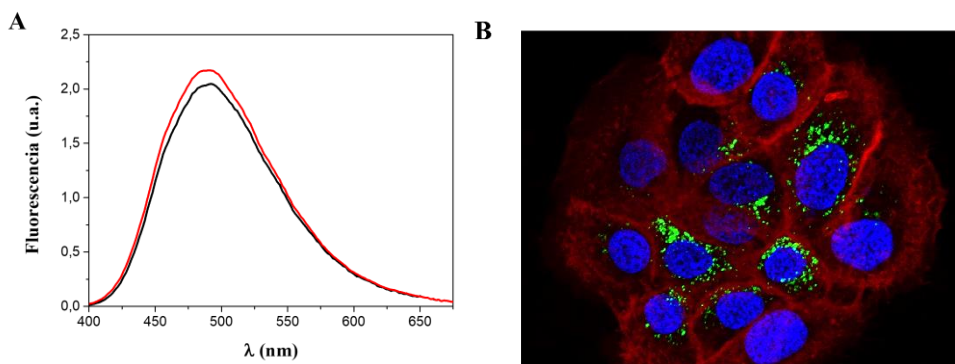
#### **4.2.9. Ensayo de detección de la enzima LDH.**

El ensayo de detección de la enzima LDH se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con RCP (0, 0,25, 1 o 3  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis UVA de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

## 4.3 Resultados y discusión.

### 4.3.1. Internalización celular de rucaparib.

En primer lugar, se registró el espectro de emisión de fluorescencia del fármaco RCP tanto en disolución acuosa (PBS) como en células para comprobar que su fluorescencia intrínseca podría utilizarse en los experimentos de microscopía confocal. Para este propósito, se trataron células HaCaT con RCP, evidenciándose así las propiedades fluorescentes del fármaco tras su internalización celular.



**Figura 20. A:** Espectros de emisión del RCP ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) tras su internalización en células HaCaT (traza roja), en disolución PBS (traza negra). Todas las disoluciones fueron isoabsortivas. **B:** Localización intracelular de RCP 20  $\mu$ M (verde) en células HaCaT marcadas con marcador de membrana CellMask Orange Plasma (rojo) y marcador de núcleo RedDot1 Far-Red (azul) por microscopía láser confocal (a la fluorescencia recogida para cada fluorocromo se les aplicó un pseudocolor).

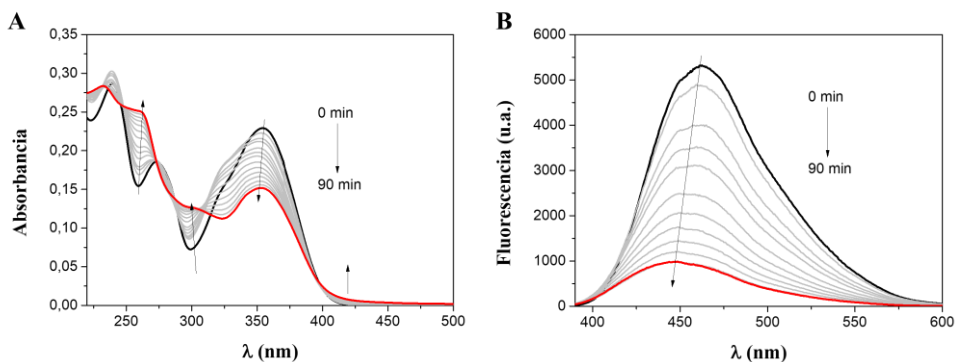
Tras registrar los espectros de emisión ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) de RCP tanto en disolución (PBS) como tras la internalización celular, se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\phi_F$ ) en disolución y en células (Figura 20A), utilizando antraceno en etanol como estándar<sup>19</sup>. Así, RCP mostró una fluorescencia intracelular con una emisión con un máximo a  $\lambda = 480$  nm y un  $\phi_F = 0,69$ , similar al obtenido en disolución acuosa ( $\phi_F = 0,65$ ). Como cabría esperar de su estructura química ( $\epsilon$ -lactama y anillo

aromático unido al indol fluorado central), su espectro de fluorescencia sufre un desplazamiento significativo hacia el rojo en comparación con el indol<sup>20</sup>.

Posteriormente, se empleó la microscopía confocal para analizar la localización intracelular del fármaco utilizando sus propiedades fluorescentes intrínsecas y los marcadores CellMask Orange Plasma y RedDot Far-Red para marcar la membrana y el núcleo celular, respectivamente. Para ello, se utilizaron como longitudes de onda de excitación 405, 543 y 662 nm para la excitación de RCP, marcador de membrana y marcador de núcleo, respectivamente, y como longitudes de onda de emisión se seleccionaron 480, 567 y 694 nm para RCP, marcador de membrana y marcador de núcleo, respectivamente. Tras 1 hora de incubación, se observó una captación eficiente de todos los componentes por parte de los queratinocitos, mostrando una distribución perinuclear como se muestra en la Figura 20B.

#### 4.3.2. Fotólisis del rucaparib.

Se irradió una disolución de rucaparib 20  $\mu\text{M}$  en metanol en un fotorreactor multilámpara en las condiciones descritas anteriormente (véase apartado 3.2.3.) y el proceso se monitorizó siguiendo los cambios en los espectros de absorción (Figura 21A) y de fluorescencia (Figura 21B) a tiempos de irradiación crecientes.



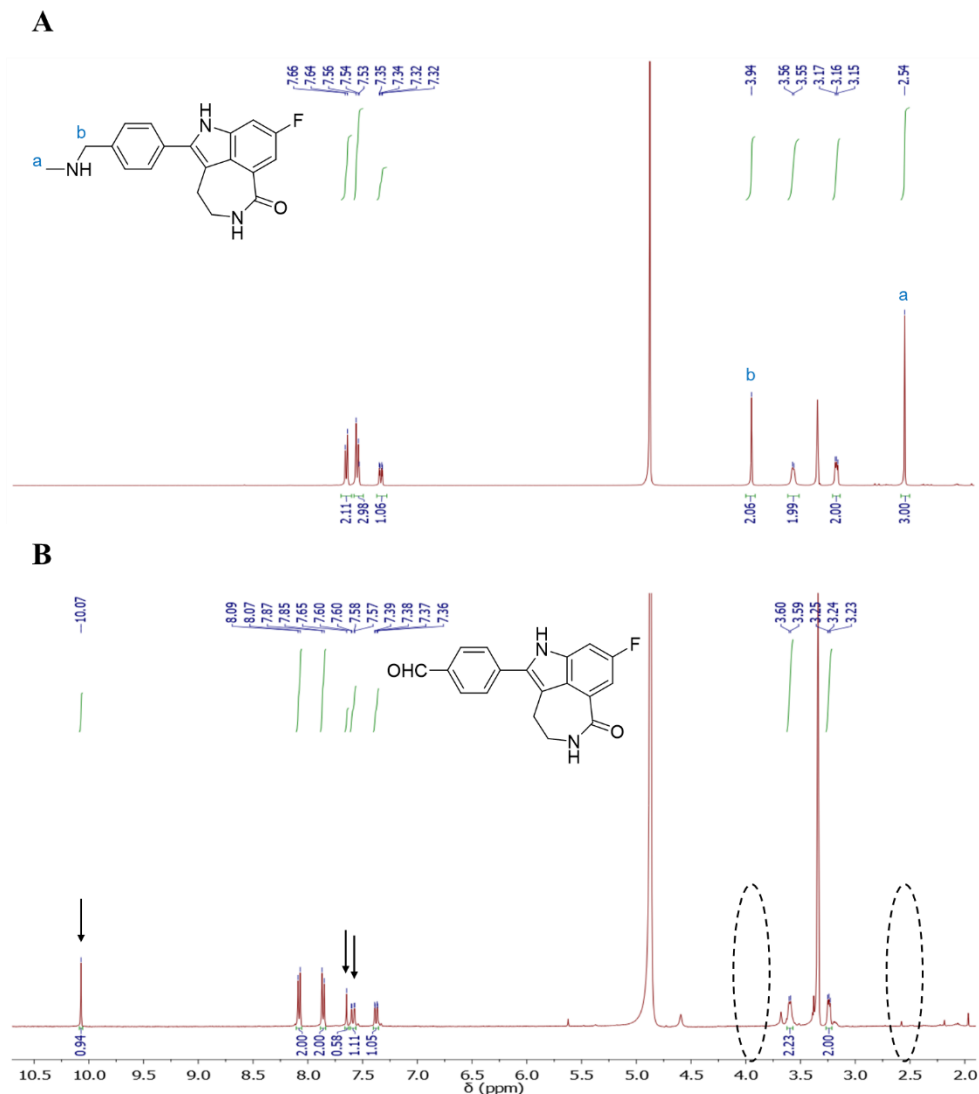
**Figura 21.** Cambio en los espectros de RCP 20  $\mu\text{M}$  en metanol tras irradiar a  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, desde 0 (negro) hasta 90 min (rojo). **A:** espectros de absorción. **B:** espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm).

Por un lado, el espectro de absorción del RCP antes de la irradiación exhibió tres máximos a  $\lambda = 240, 275$  nm y 355 nm. Tras 90 min de irradiación, los dos primeros se desplazaron a longitudes de onda menor ( $\lambda = 230, 265$  nm) y el tercero desapareció. También se observó un ligero aumento de la absorbancia residual a partir de 400 nm.

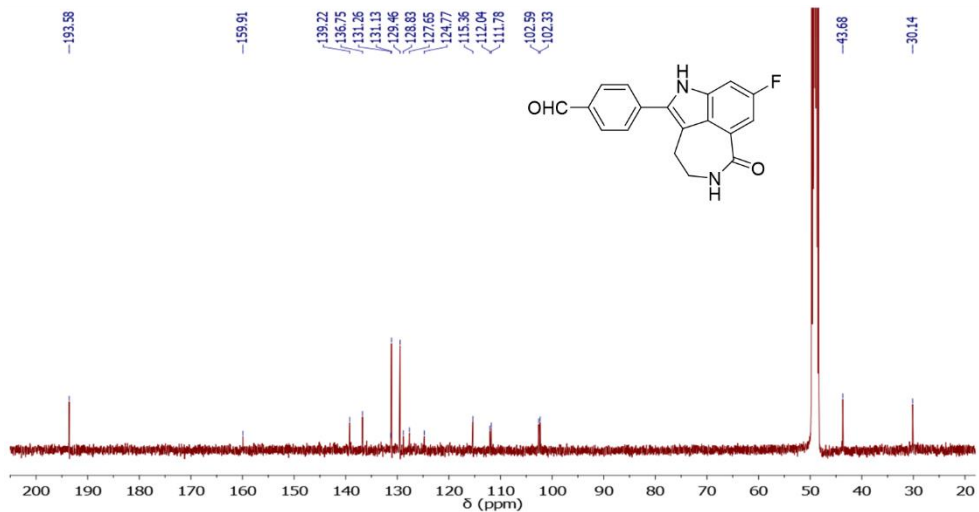
Por otro lado, también se apreciaron cambios significativos en los espectros de fluorescencia, donde la banda inicial de RCP centrada a  $\lambda = 460$  nm disminuyó en función de los tiempos de irradiación (trazas grises) hasta reducirse gran parte de su intensidad de fluorescencia y observarse además un ligero desplazamiento hipsocrómico de la banda principal a  $\lambda = 445$  nm tras 90 minutos de irradiación (traza roja).

Con el fin de investigar si se había formado algún fotoproducto estable, se irradió una disolución de RCP (1 mg/mL, 20 mL) en metanol durante 150 minutos en el fotorreactor descrito anteriormente ( $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm). Transcurrido ese tiempo, se evaporó el disolvente y el crudo resultante se purificó por HPLC (1:1 MeCN/H<sub>2</sub>O al 0,1 % de TFA como eluyente), obteniéndose un sólido amarillo. El espectro de masas de alta resolución obtenido por ESI dio un pico MH<sup>+</sup> a 309,1039 uma, que corresponde a  $M = C_{18}H_{14}N_2O_2F$ . Está pérdida de 15 uma respecto al fármaco original (MH<sup>+</sup> = 324,1523,  $M = C_{19}H_{19}N_3OF$ ) coincide con la pérdida de 1 carbono, 5 hidrógenos y 1 nitrógeno y la ganancia de 1 oxígeno. Así, para elucidar la estructura del fotoproducto resultante, se realizaron experimentos de RMN de protón, tanto del fármaco original como del fotoproducto resultante. Comparando ambos espectros (Figura 22A y Figura 22B, respectivamente), se observaron los siguientes cambios: i) la ausencia de las señales correspondientes a H<sub>a</sub> a  $\delta = 2,54$  ppm y H<sub>b</sub> a  $\delta = 3,94$  ppm del espectro RCP en el espectro del fotoproducto, ii) la aparición de una nueva señal a  $\delta = 7,55$  ppm en el fotoproducto, iii) el desplazamiento del sistema AB del fenilo del RCP ( $\delta = 7,65$  ppm y  $\delta = 7,55$  ppm) a  $\delta = 8,08$  ppm y  $\delta = 7,86$  ppm, iv) aparecen dos nuevas señales a  $\delta = 10,07$  ppm y  $\delta = 7,65$  ppm que no estaban presentes en el espectro del RCP. Teniendo en cuenta estos cambios y observando

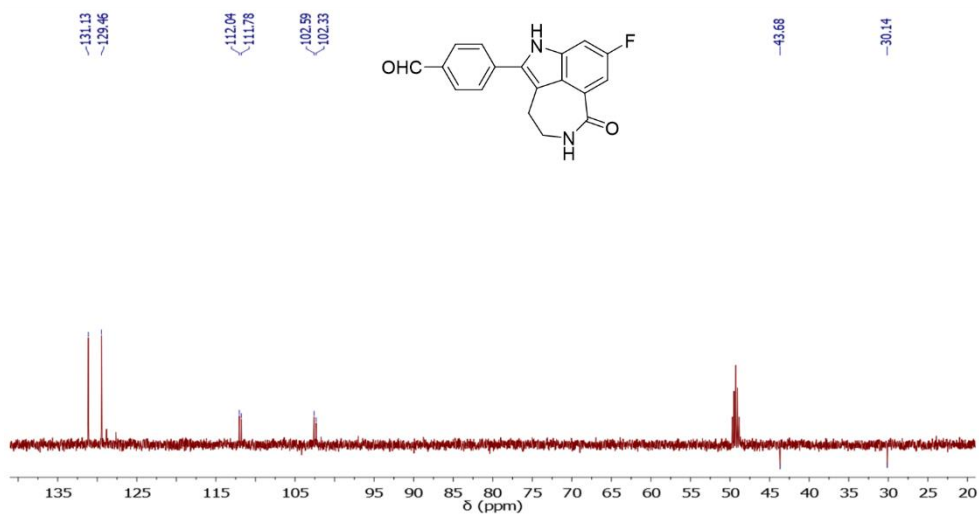
los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT y HSQC (Figura 23A, B, C), se propuso como estructura química del fotoproducto la desaminación oxidativa del carbono bencílico a un aldehído, representada en la Figura 24.



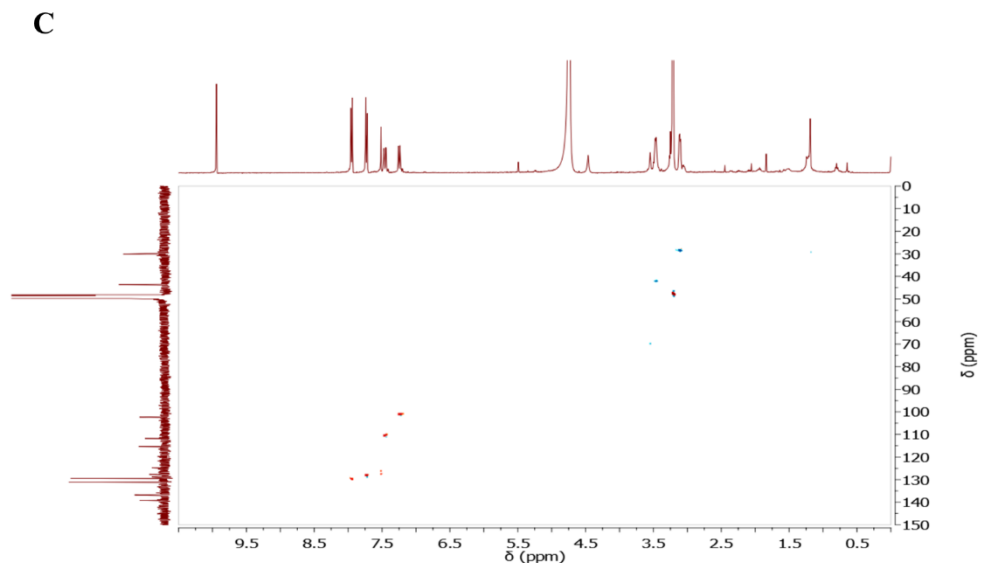
**A**



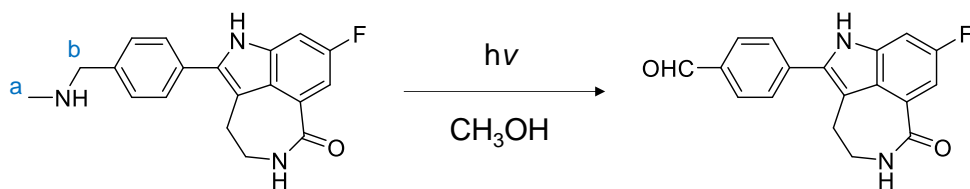
**B**







**Figura 23.** Espectros de RMN del fotoproducto del rucaparib en  $\text{CD}_3\text{OD}$ . **A:** RMN- $^{13}\text{C}$ , **B:** DEPT y **C:** HSQC.

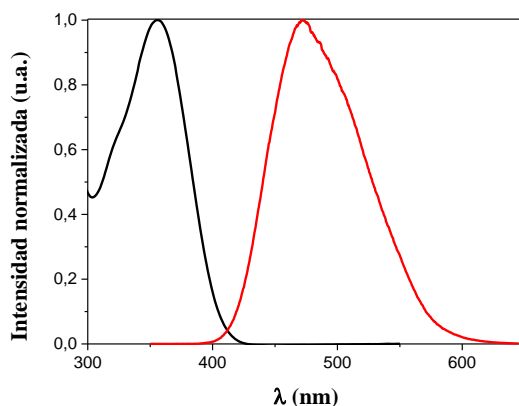


**Figura 24.** Estructura química del fotoproducto del RCP obtenido tras irradiar el fármaco en metanol.

Teniendo en cuenta que este fotoproducto ha sido obtenido en metanol y que la irradiación del fármaco en PBS sigue otra cinética en la que se necesitaron 8 horas de irradiación para detectar cambios significativos por HPLC, la investigación del potencial fototóxico de este fotoproducto no se consideró necesaria, ya que la generación de dicho fotoproducto en medio acuoso requeriría una dosis de irradiación UVA de al menos  $150 \text{ J/cm}^2$ , una dosis totalmente inviable a nivel biológico.

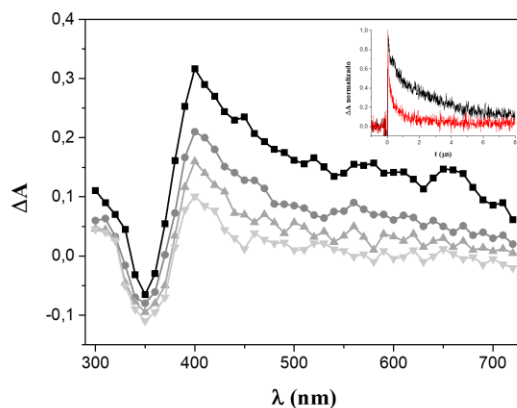
### 4.3.3. Propiedades fotofísicas.

A partir de los espectros normalizados de absorción y fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 350$  nm), la energía del primer estado excitado singlete ( $E_s$ ) obtenido a partir de la intersección entre ambos espectros (Figura 25), es de 68,8 kcal/mol.



**Figura 25.** Espectros normalizados de absorción (traza negra) y fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 355$  nm, traza roja) de RCP 20  $\mu$ M en PBS.

El espectro de absorción transitoria del RCP en acetonitrilo (30  $\mu$ M,  $\lambda_{exc} = 355$  nm,  $N_2$ ) se obtuvo utilizando la técnica de fotólisis de destello láser. Así, la banda, con un máximo a  $\lambda = 450$  nm (Figura 26) se atribuyó a la formación de un catión radical que era capaz de desactivarse en presencia del metanol, característica de estas especies transitorias (Figura 26, figura insertada), y su tiempo de vida ( $\tau_{RCP^+}$ ) en atmósfera de  $N_2$  fue de 3,1  $\mu$ s.



**Figura 26.** Fotólisis de destello láser del rucaparib (30  $\mu\text{M}$ ) en acetonitrilo a  $\lambda = 355 \text{ nm}$ . Espectro de absorción transitoria a diferentes ventanas de tiempo (desde 0,5 hasta 15  $\mu\text{s}$ ) en atmósfera de  $\text{N}_2$ . Gráfica insertada: cinéticas de desactivación normalizadas monitorizadas a  $\lambda = 450 \text{ nm}$  en ausencia (negro) o presencia (rojo) de metanol (100  $\mu\text{L}$ ).

Las principales propiedades fotofísicas del RCP se recopilan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Principales propiedades fotofísicas del RCP.

$\lambda_{\text{max abs}} \text{ (nm)}^{\text{a, b}}$	240, 275, 355
$\lambda_{\text{max em}} \text{ (nm)}^{\text{a, c}}$	480
$E_s \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}^{\text{a}}$	68,8
$\phi_F^{\text{a}}$	0,65
$\tau_F \text{ (ns)}^{\text{a}}$	6,8
$\tau_{\text{RCP}^{+\cdot}} \text{ (}\mu\text{s)}^{\text{d, e}}$	3,1
$\lambda_{\text{max abs}} \text{ (nm)}^{\text{d, e}}$	450

<sup>a</sup> 20  $\mu\text{M}$ , PBS, temperatura ambiente, aire; <sup>b</sup> espectroscopía de absorción;

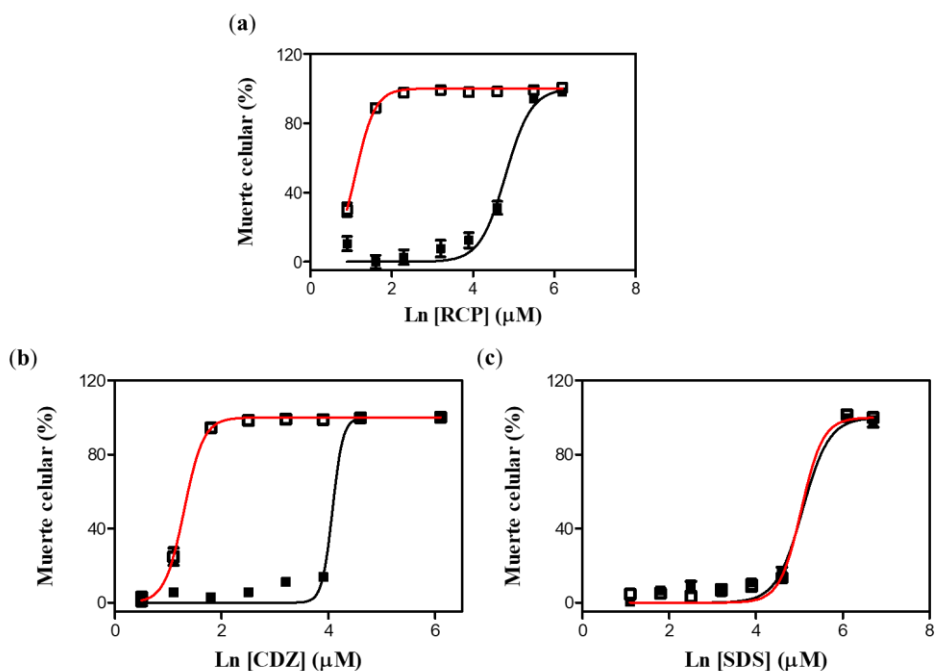
<sup>c</sup> espectroscopía de emisión; <sup>d</sup> espectroscopía de absorción transitoria; <sup>e</sup> 30  $\mu\text{M}$ , acetonitrilo, temperatura ambiente,  $\text{N}_2$ .

#### 4.3.4. Evaluación de la fototoxicidad *in vitro* inducida por rucaparib.

##### Captación de rojo neutro (NRU)

Con el fin de evaluar el potencial fototóxico del RCP en combinación con la radiación ultravioleta, se evaluó la fototoxicidad *in vitro* utilizando queratinocitos humanos

inmortalizados (HaCaT). Para ello, se determinó la viabilidad de las células HaCaT, tanto en condiciones de oscuridad o tras irradiar con luz UVA, tratadas con concentraciones crecientes de del fármaco (2,5 – 500  $\mu\text{M}$ ), utilizando el colorante rojo neutro como indicador de viabilidad celular y la clorpromazina (CPZ) y el dodecilsulfato sódico (SDS) como controles positivo y negativo, respectivamente. De esta forma, los valores de  $\text{IC}_{50}$  fueron determinados a partir de las curvas de dosis-respuesta (Figura 27), y a partir de estos se calculó el valor del factor de fotoirritación (PIF), que corresponde a la relación entre los valores de  $\text{IC}_{50}$  en oscuridad o luz.



**Figura 27.** Curvas dosis respuesta de viabilidad celular de células HaCaT tratados con rucaparib (RCP, **a**). Se emplearon clorpromazina (CPZ, **b**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **c**) como controles positivo y negativo de fototoxicidad en presencia ( $\square$ ) o ausencia ( $\blacksquare$ ) de luz UVA ( $5 \text{ J/cm}^2$ ). Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

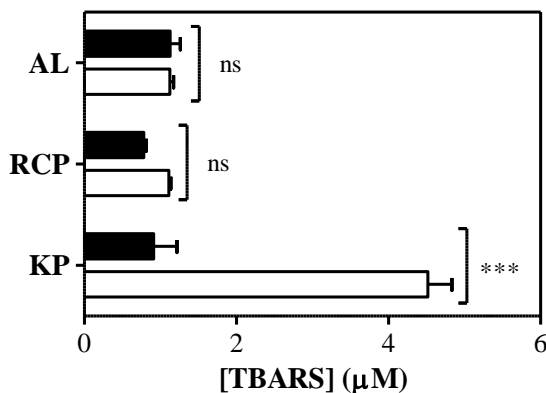
Los resultados se muestran en la Tabla 7, donde se manifiesta que RCP es un compuesto claramente fototóxico ( $IC_{50}$  oscuridad =  $122 \pm 11 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  luz UVA =  $3 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ), con un valor PIF cercano a 41, tres veces superior al del control positivo (clorpromazina, CPZ), aunque fue significativamente menos citotóxico que la CPZ en condiciones de oscuridad, revelando valores de  $IC_{50}$  similares para ambos compuestos (3 y  $3,7 \mu\text{M}$ , respectivamente) tras la irradiación UVA. Esto corrobora que el valor PIF obtenido más alto corresponde a rucaparib.

**Tabla 7.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) y PIF obtenidos a partir del ensayo de fototoxicidad HaCaT NRU *in vitro* de RCP realizado a  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ .

Compuesto	$IC_{50}$ (oscuridad)	$IC_{50}$ luz UVA	PIF <sup>1</sup>
CPZ	$59 \pm 14$	$3,7 \pm 0,2$	16
SDS	$160 \pm 29$	$155 \pm 41$	1
RCP	$122 \pm 11$	$3 \pm 0,1$	41

Los datos corresponden con la media  $\pm$  s de cuatro experimentos realizados en triplicado. <sup>1</sup>De acuerdo con las directrices de la OECD 432 (2019),  $PIF < 2$  indica "no fototoxicidad",  $2 < PIF < 5$  indica "fototoxicidad probable" y  $PIF > 5$  indica "fototoxicidad".

La fototoxicidad inducida por fármacos puede provocar daño celular, especialmente a los componentes celulares clave tales como los lípidos, las proteínas y el ADN. Teniendo en cuenta que no se observó fotoperoxidación lipídica con el método del ácido tiobarbitúrico (TBA)<sup>21, 22</sup> (Figura 28), esto indicaría que probablemente la fototoxicidad observada podría atribuirse tanto a proteínas como al ADN.

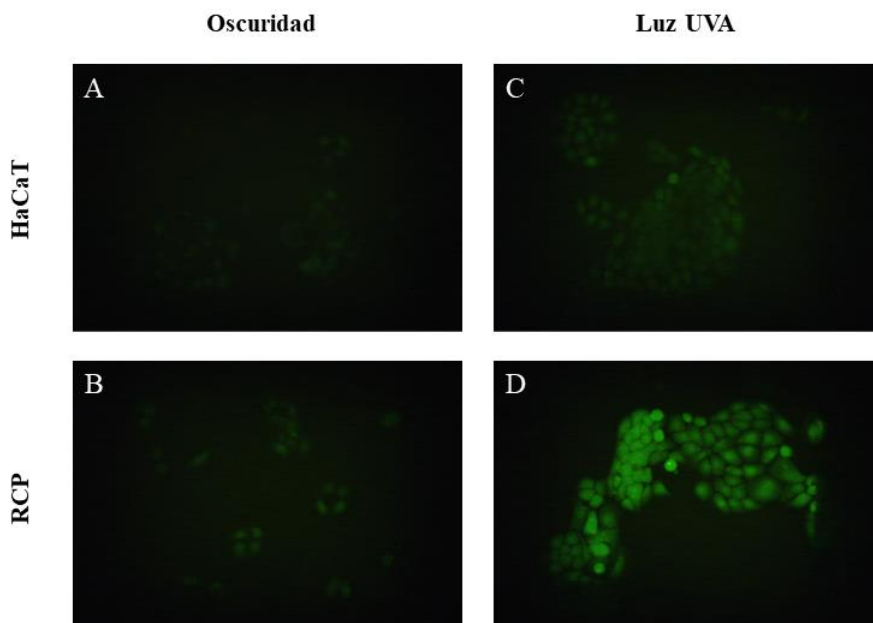


**Figura 28.** Fotoperoxidación lipídica por rucaparib. Se irradiaron disoluciones de ácido linoleico (AL, 1 mM) en ausencia o presencia de RCP (50 µM) a una dosis de 15 J/cm<sup>2</sup>. Se utilizó ketoprofeno (KP, 100 µM) como control positivo. La fotoperoxidación lipídica se determinó mediante la medición de las sustancias reactivas del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) utilizando el método del TBA. Los datos representan la media ± s de dos experimentos independientes realizados por duplicado en condiciones de oscuridad (■) o luz UVA (□). Los asteriscos indican diferencias significativas mediante el test t-Student (ns: no significativo, \*\*\**p* < 0,001).

#### *Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).*

Dado que el RCP muestra un perfil fototóxico, es interesante explorar la posibilidad de generación de ROS tras irradiación UVA, ya que generalmente estas especies son las responsables de la oxidación de biomoléculas y/o membranas celulares.

Para ello, se sembraron células HaCaT en placas de 12 pocillos y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de RCP (0, 2, 5 y 10 µM) en condiciones de oscuridad o bajo una dosis de irradiación UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>. Seguidamente, tras la tinción de las células con 25 µM de diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA), se registró la fluorescencia de todas las muestras mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro de fluoresceína FITC. En la Figura 29 presentada a continuación, las imágenes A y B corresponden a las muestras no irradiadas, mientras que las imágenes C y D se obtuvieron tras la irradiación.

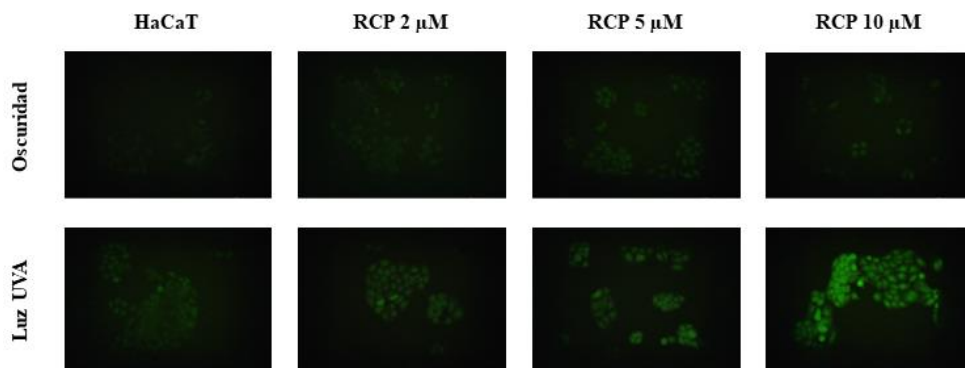


**Figura 29.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de experimentos ROS con rucaparib (10  $\mu\text{M}$ ). Los queratinocitos (HaCaT) fueron incubados en ausencia (A, C) o presencia de RCP (B, D), mantenidos en oscuridad (A, B) o irradiados (C, D) con luz UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Todas las muestras fueron tratadas con diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) 25  $\mu\text{M}$ .

La actividad ROS observada en condiciones de oscuridad fue despreciable, tanto en ausencia (A) como en presencia de RCP (B). Este último resultado es el que cabría esperar, ya que el valor de  $\text{IC}_{50}$  obtenido en oscuridad fue de 122  $\mu\text{M}$ , muy alejado de la concentración empleada (10  $\mu\text{M}$ ). Por el contrario, tras el tratamiento de las células con RCP seguido de irradiación UVA (D), se registró una amplia señal de fluorescencia, lo que muestra la capacidad del fármaco para inducir ROS tras la radiación UVA. Además, los experimentos control realizados con las células sin irradiar e irradiadas en ausencia del fármaco (A, B) no dieron ninguna señal de fluorescencia, indicando la idoneidad de la dosis empleada.

Para obtener una mejor correlación entre la fluorescencia y la cantidad de RCP empleada, se realizaron experimentos adicionales utilizando concentraciones de

RCP de 2, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos (Figura 30) mostraron un aumento de la generación de ROS conforme aumenta la concentración del fármaco.

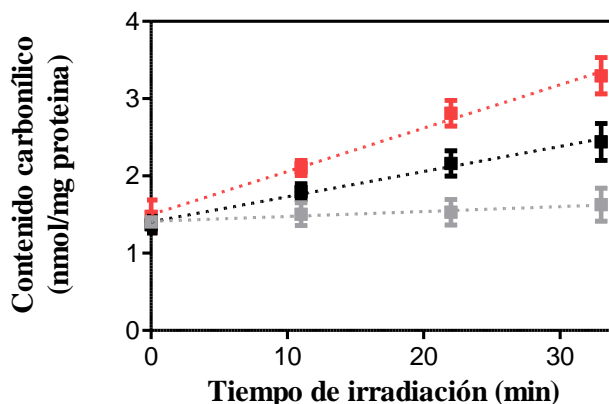


**Figura 30.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de experimentos ROS. Se incubaron queratinocitos en presencia (2, 5 o 10  $\mu\text{M}$ ) o ausencia de RCP y se trataron con  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  25  $\mu\text{M}$ . Oscuridad: células no irradiadas. Luz UVA: células irradiadas con luz UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

#### *Evaluación de la fotooxidación a proteínas.*

En las proteínas, la carbonilación de éstas es la modificación oxidativa más frecuente, y generalmente irreversible. Teniendo en cuenta que RCP se une a las proteínas plasmáticas, se utilizó la albúmina sérica humana (ASH) como proteína modelo para determinar el contenido carbonílico de sistemas RCP/ASH como un posible biomarcador de daño oxidativo, el cual se determinó a partir de la derivatización de los carbonilos con DNPH. En este contexto, se irradiaron disoluciones de PBS que contenían ASH (0,075  $\mu\text{M}$ ) y RCP (0, 5 o 10  $\mu\text{M}$ ) a diferentes dosis de luz UVA (0, 5, 10 y 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) y posteriormente se midió el contenido carbonílico de todas las condiciones.



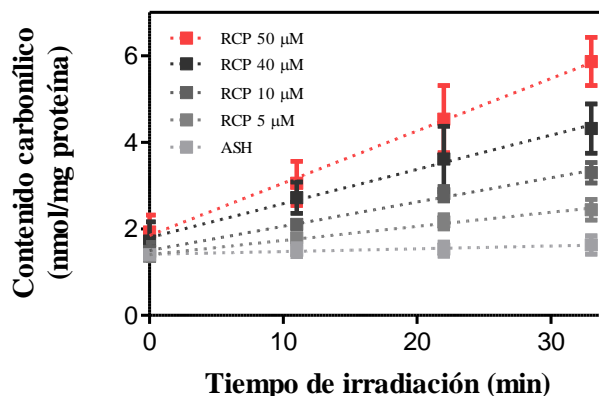


**Figura 31.** Fotooxidación de proteínas por rucaparib determinados midiendo el contenido carbonílico utilizando el método de derivatización con DNPH. Disoluciones de ASH (0,075  $\mu\text{M}$ ) en ausencia (gris) o presencia de RCP (5  $\mu\text{M}$ , negro; 10  $\mu\text{M}$ , rojo) se irradiaron a diferentes tiempos de irradiación. Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tal y como se muestra en la Figura 31, para cada concentración de RCP, la concentración de carbonilos generados *in situ* se ajustó a una cinética de orden cero, ya que el contenido carbonílico de las muestras era directamente proporcional a la dosis de irradiación UVA. Así, los valores de la constante obtenidos para RCP a 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  fueron de 0,033 y 0,056 nmol·min/mg de proteína, respectivamente.

Además, teniendo en cuenta que la absorción de la ASH en la región del UVA es despreciable, el contenido carbonílico de las muestras de ASH sin fármaco se mantuvo constante independientemente de la dosis de irradiación empleada, lo que indica la idoneidad de las dosis de irradiación UVA manejadas en este experimento para evitar falsos positivos.

Adicionalmente, para estudiar la tendencia de la fotooxidación de ASH en función de la cantidad de RCP, se llevó a cabo un nuevo experimento con un rango de fármaco más amplio (0, 5, 10, 40, 50  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 32.** Fotooxidación de proteínas por rucaparib. Se irradiaron disoluciones de ASH (0,075  $\mu$ M) solas o en presencia de RCP (5, 10, 40, o 50  $\mu$ M) a 0, 11, 22 y 33 minutos, que corresponde con una dosis UVA de 0, 5, 10 y 15 J/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Como se aprecia en la Figura 32, la presencia de RCP aumentó significativamente la concentración de carbonilo en ASH tras la irradiación UVA, hasta triplicarse su valor con respecto a la muestra no irradiada, indicando claramente la capacidad de este fármaco para promover fotooxidación en las proteínas de las membranas celulares. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el test NRU, donde RCP mostró un gran potencial fototóxico.

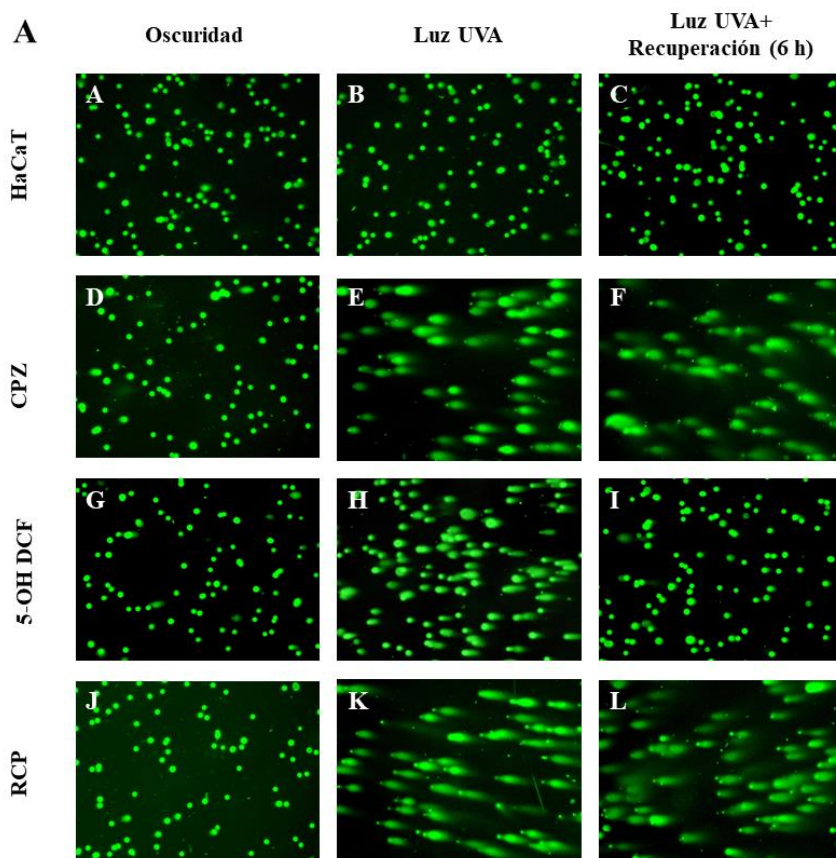
#### *Fotogenotoxicidad inducida por rucaparib.*

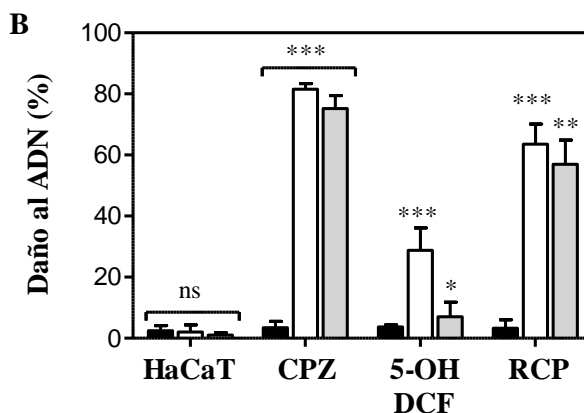
El ensayo cometa en condiciones alcalinas es una técnica ampliamente utilizada para revelar roturas de cadena simple, de cadena doble y sitios alcalinos lábiles en el ADN de una célula<sup>23</sup>.

Para detectar el fotodaño inducido al ADN celular, se incubaron los queratinocitos con RCP 50  $\mu$ M durante 30 min, se expusieron a una dosis de irradiación UVA de 2 J/cm<sup>2</sup> y se embebieron en agarosa sobre un portaobjetos. Dado que la muerte celular puede promover la fragmentación de ADN mediante la activación de las ADNasas activadas por caspasas, se comprobó la viabilidad celular previamente a

la gelificación mediante el ensayo de exclusión con azul de tripán<sup>24</sup>, para evitar falsos positivos. Como la tasa de viabilidad celular obtenida fue superior al 85 %, se garantizó la idoneidad de la dosis UVA y la concentración de fármaco utilizadas, puesto que en la bibliografía se indica que, para garantizar resultados fiables de este ensayo, la viabilidad celular debe ser de al menos entre un 70 – 80 %<sup>25, 26</sup>.

A continuación, se realizó la electrofóresis en condiciones alcalina para permitir que el ADN dañado y fragmentado migrara del núcleo. Tras la tinción con SYBR® Gold, se analizó la fluorescencia de los nucleoides y las colas del cometa con la ayuda de un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de fluorescencia FITC. Finalmente, el porcentaje de daño al ADN se calculó utilizando la escala de puntuación visual<sup>27</sup> de al menos 100 cometas de ADN

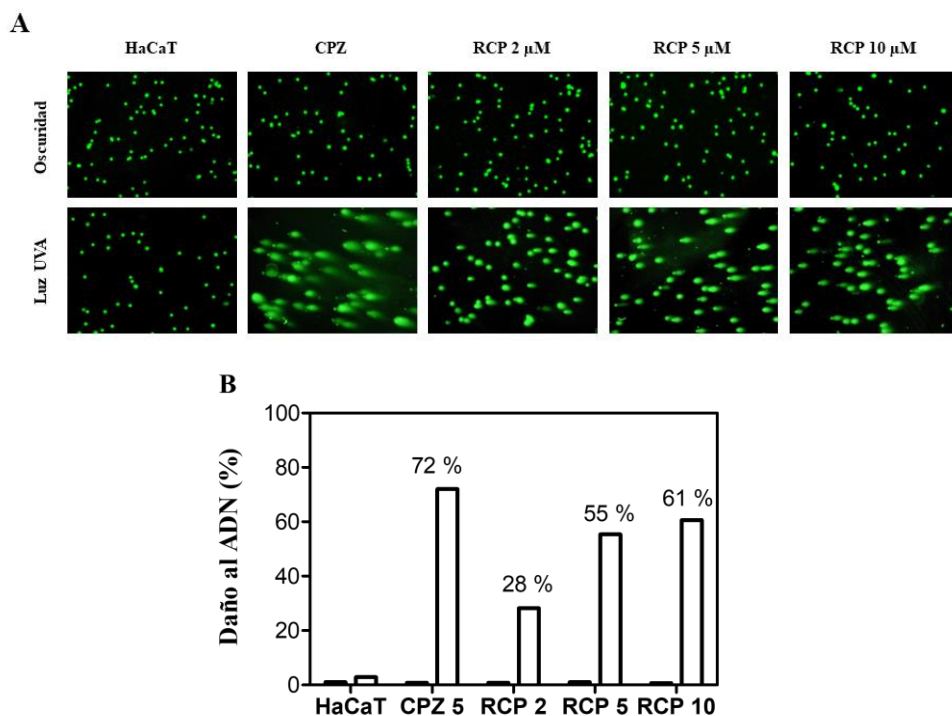




**Figura 33. A:** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de los experimentos del ensayo cometa. Los queratinocitos sin tratar (A, B, C) y tratados con CPZ 5  $\mu$ M (D, E, F), 5-OH DCF 100  $\mu$ M (G, H, I) o RCP 50  $\mu$ M (J, K, L) se irradiaron con una dosis de luz UVA 2 J/cm<sup>2</sup> (B, E, H, K) o tras la irradiación, se incubaron durante 6 h a 37 °C para permitir la recuperación al daño (C, F, I, L). **B:** Porcentaje de daño al ADN de queratinocitos sin tratar (HaCaT) o tratados con CPZ, 5-OH DCF o RCP. Los datos representan la media  $\pm$  s de cuatro experimentos independientes en condiciones de oscuridad (■), luz UVA (□) o luz UVA + recuperación (▒). Los asteriscos indican las diferencias significativas obtenidas mediante el test t-Student (ns: no significativo, \* $p$  < 0,05, \*\* $p$  < 0,01, \*\*\* $p$  < 0,001).

Como se muestra en la Figura 33, el ensayo cometa reveló un daño al ADN significativo causado por RCP en combinación con la luz UVA (alrededor de un 60 % de daño). Para combatir este daño, las células han desarrollado varias vías de reparación del ADN; sin embargo, si la reparación no se realiza correctamente, las lesiones del ADN restantes pueden dar lugar a mutaciones. Es por ello que, para evaluar si las células HaCaT eran capaces de reparar el daño fotoinducido al ADN por RCP, se realizaron una serie de ensayos adicionales donde tras la irradiación, se incubaron las células en medio DMEM durante 6 horas para permitir la reparación de dicho daño. Como hecho relevante, tras 6 horas de tiempo de recuperación, no se observó una reducción significativa del daño ADN nuclear, indicando una irreversibilidad este daño.

Adicionalmente, para comprobar la correlación entre los ensayos de fototoxicidad y fotogenotoxicidad, se llevaron a cabo un nuevo conjunto de experimentos utilizando la misma dosis de UVA que la utilizada en el ensayo NRU ( $5 \text{ J/cm}^2$ ) y concentraciones de RCP cercanas a su  $\text{IC}_{50}$  en luz UVA (2, 5, y  $10 \mu\text{M}$ ) (Figura 34). A pesar de que las condiciones entre experimentos eran diferentes, al comparar ambos experimentos ( $50 \mu\text{M}$  a  $2 \text{ J/cm}^2$  y 5,  $10 \mu\text{M}$  a  $5 \text{ J/cm}^2$ ), se obtuvo una buena correlación obteniéndose así un porcentaje de daño al ADN de alrededor del 60 % en ambos casos.



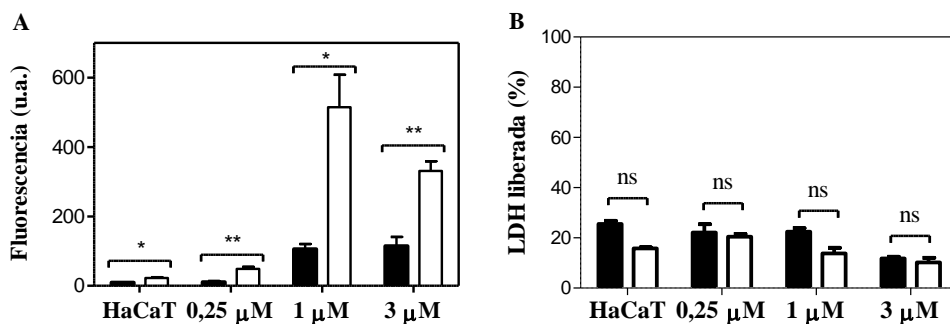
**Figura 34.** Ensayo cometa realizado con una dosis UVA de  $5 \text{ J/cm}^2$ . **A:** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de los experimentos del ensayo cometa. HaCaT: queratinocitos sin tratamiento. CPZ: células tratadas con clorpromazina ( $5 \mu\text{M}$ ). RCP: células tratadas con RCP (2, 5 o  $10 \mu\text{M}$ ). Oscuridad: Células no irradiadas. Luz UVA: Células irradiadas con luz UVA ( $5 \text{ J/cm}^2$ ). **B:** Porcentaje del daño al ADN mediante recuento visual de células tratadas (HaCaT) o tratadas con CPZ o RCP en oscuridad (■) o con luz UVA (□).

#### 4.3.5. Mecanismo de muerte celular.

Se conoce que, ante la generación de un daño celular, las células activan los mecanismos de reparación celular oportunos para reparar dicho daño. Sin embargo, si este daño no es reparado adecuadamente, su acumulación sistemática puede provocar en primera instancia la muerte celular, la cual sucede principalmente por apoptosis o necrosis<sup>28</sup>. Con el fin de investigar si el mecanismo de muerte celular inducido por RCP en combinación con radiación UVA es por apoptosis o necrosis, se realizaron dos ensayos experimentales: el ensayo de activación de caspasa-3/7 y el ensayo de liberación de la L-lactato deshidrogenasa.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada ampliamente conocido, donde la actividad enzimática de las caspasas 3 y 7 son las principales responsables de este evento y su sobreexpresión conducen irreversiblemente a la muerte celular. En este contexto, se cuantificó la actividad de las caspasas-3/7 por medio de un sustrato profluorescente (Z-DEVD-R110) que, en presencia de estas enzimas caspasas, se libera rodamina 110 (R110), un compuesto fluorescente. Así, se determinó la apoptosis de forma indirecta a través de la medición de la intensidad de fluorescencia de R110 tras su liberación por las células tratadas con cantidades crecientes de RCP.

Por otro lado, la L-lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática que cataliza la conversión de lactato en piruvato, convirtiendo NAD<sup>+</sup> en NADH durante el proceso de glucólisis<sup>29</sup>. El ensayo de liberación de la LDH se utiliza para evaluar el daño a la membrana plasmática, ya que la generación de un daño a la membrana celular induce un aumento de la permeabilidad de ésta, provocando la liberación de esta enzima al medio extracelular<sup>30</sup>. Teniendo en cuenta que el factor clave durante la necrosis es la permeabilización de la membrana plasmática, la medida de la LDH liberada puede considerarse como un indicador de necrosis. Sin embargo, cabe destacar que la liberación de la LDH también puede estar involucrada en etapas tardías de la apoptosis<sup>31</sup>.



**Figura 35.** Mecanismo de muerte celular inducido por rucaparib (RCP). **A:** Fluorescencia de la rodamina 110 tras el ensayo de activación de caspasa-3/7 de células tratadas con RCP **B:** Porcentaje de la enzima L-lactato deshidrogenasa (LDH) liberada tras el tratamiento de células con RCP. Ambos experimentos se realizaron con concentraciones de fármaco de 0, 0,25, 1 y 3  $\mu\text{M}$  en oscuridad (■) o tras la irradiación (□) con luz UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Los datos representan la media  $\pm$  s de dos experimentos independientes realizados por triplicado en condiciones de oscuridad o luz UVA. Los asteriscos indican las diferencias significativas obtenidas mediante el test t-Student (ns: no significativo, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Como se muestra en la Figura 35A, se observó un incremento de la actividad caspasa-3/7 tras el tratamiento con RCP y posterior irradiación UVA. Es interesante remarcar que la actividad máxima de la caspasa-3/7 se observó en 1  $\mu\text{M}$  de RCP, que corresponde con una concentración inferior que su  $\text{IC}_{50}$  UVA (3  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, cuando la concentración de RCP es próxima a su  $\text{IC}_{50}$  UVA, la actividad enzimática se reduce debido a que la fototoxicidad del fármaco ya ha provocado parte de la muerte celular.

Al contrario de lo que se observó en el experimento de la apoptosis, los resultados obtenidos en la Figura 35B no revelaron ningún aumento de la LDH liberada tras el tratamiento con RCP y posterior irradiación con luz UVA con respecto al control negativo, es decir, las células sin tratar. Es por ello que, de acuerdo con estos resultados, se puede concluir que el RCP en combinación con la radiación ultravioleta provoca la muerte celular programada.

#### 4.4. Conclusiones.

En resumen, este trabajo ha demostrado que el fármaco anticancerígeno rucaparib tiene capacidad para desencadenar reacciones de fotosensibilidad. Por un lado, el ensayo de viabilidad celular *in vitro* NRU ha demostrado el gran potencial fototóxico de dicho fármaco. Esta fototoxicidad se puede atribuir al daño fotosensibilizado hacia las principales biomoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN), donde la fotoperoxidación lipídica resultó insignificante al evaluarse mediante el método del ácido tiobarbitúrico. En cambio, la oxidación fotosensibilizada por RCP de ASH, evaluada por el método de carbonilación de proteínas, y el daño fotoinducido al ADN por RCP, revelado por el ensayo cometa, indicaron el potencial fototóxico y fotogenotóxico de este fármaco.

Por otro lado, RCP es capaz de generar especies reactivas de oxígeno tras irradiación UVA, lo que podría desencadenar un daño por estrés oxidativo y la posterior muerte celular. Así, el mecanismo de muerte celular inducido por apoptosis fue el observado tras la combinación simultánea del fármaco y la radiación UVA.

Finalmente, cabe destacar que estos resultados son muy relevantes en relación a la fotoseguridad del rucaparib y conviene enfatizar que este es el primer ejemplo de un inhibidor de la PARP-1/2 que es capaz de inducir daño fotosensibilizado a biomoléculas, y la metodología empleada podría extenderse a otros inhibidores de las PARPs para evaluar posibles reacciones de foto(geno)toxicidad.



#### 4.5. Bibliografía.

1. Sonnenblick, A.; de Azambuja, E.; Azim, H. A., Jr.; Piccart, M. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12* (1), 27-41.
2. Michelena, J.; Lezaja, A.; Teloni, F.; Schmid, T.; Imhof, R.; Altmeyer, M. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2678.
3. Schreiber, V.; Dantzer, F.; Ame, J.-C.; de Murcia, G. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7* (7), 517-528.
4. Cetin, B.; Wabl, C. A.; Gumusay, O. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2020**, *156*, 103117.
5. Helleday, T.; Lo, J.; van Gent, D. C.; Engelward, B. P. *DNA Repair* **2007**, *6* (7), 923-935.
6. Weil, M. K.; Chen, A. P. *Curr. Probl. Cancer.* **2011**, *35* (1), 7-50.
7. Cortesi, L.; Rugo, H. S.; Jackisch, C. *Target. Oncol.* **2021**, *16* (3), 255-282.
8. Zheng, F.; Zhang, Y.; Chen, S.; Weng, X.; Rao, Y.; Fang, H. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *123*, 109661.
9. Drew, Y.; Ledermann, J.; Hall, G.; Rea, D.; Glasspool, R.; Highley, M.; Jayson, G.; Sludden, J.; Murray, J.; Jamieson, D.; Halford, S.; Acton, G.; Backhler, Z.; Mangano, R.; Boddy, A.; Curtin, N.; Plummer, R. *Br. J. Cancer* **2016**, *114* (7), 723-30.
10. Mariappan L, J. X., Jackson J, Drew Y. *Int. J. Womens Health* **2017**, *9*, 913-924.
11. O'Ceirbhail, R. E. *Oncology (Williston Park)* **2018**, *32* (7), 339-343.
12. Anscher, M. S.; Chang, E.; Gao, X.; Gong, Y.; Weinstock, C.; Bloomquist, E.; Adeniyi, O.; Charlab, R.; Zimmerman, S.; Serlemitsos-Day, M.; et al. *The oncologist* **2021**, *26* (2), 139-146.

13. Ledermann, J. A.; Oza, A. M.; Lorusso, D.; Aghajanian, C.; Oaknin, A.; Dean, A.; Colombo, N.; Weberpals, J. I.; Clamp, A. R.; Scambia, G.; et al. *Lancet Oncol.* **2020**, *21* (5), 710-722.
14. Vayá, I.; Andreu, I.; Lence, E.; González-Bello, C.; Consuelo Cuquerella, M.; Navarrete-Miguel, M.; Roca-Sanjuán, D.; Miranda, M. A. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (68), 15922-15930.
15. García-Lainez, G.; Vayá, I.; Marín, M. P.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95* (1), 169-178.
16. Agúndez, J. A. G.; García-Martín, E.; García-Lainez, G.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 6879.
17. Garcia-Lainez, G.; Martínez-Reig, A. M.; Limones-Herrero, D.; Consuelo Jiménez, M.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *341*, 51-55.
18. Palumbo, F.; Garcia-Lainez, G.; Limones-Herrero, D.; Coloma, M. D.; Escobar, J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *313*, 131-137.
19. Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65* (2), 229-235.
20. Kossatz, S.; Carney, B.; Farley, C.; Weber, W. A. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (8), 1316-1320.
21. Seto, Y.; Inoue, R.; Kato, M.; Yamada, S.; Onoue, S. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2013**, *120*, 44-51.
22. Zeb, A.; Ullah, F. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, *2016*, 9412767.
23. Collins, A. R. *Methods. Mol. Biol.* **2002**, *203*, 163-177.
24. Strober, W. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *111*, A3.B.1-a3.B.3.
25. Azqueta, A.; Collins, A. R. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (6), 949-968.
26. Gleis, M.; Schneider, T.; Schlörmann, W. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90* (10), 2315-2336.

27. Møller, P. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2006**, 612 (2), 84-104.
28. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D. W.; et al. *Cell Death Differ.* **2018**, 25 (3), 486-541.
29. Kaja, S.; Payne, A. J.; Singh, T.; Ghuman, J. K.; Sieck, E. G.; Koulen, P. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2015**, 73, 1-6.
30. Chan, F. K.; Moriwaki, K.; De Rosa, M. J. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 979, 65-70.
31. Parhamifar, L.; Andersen, H.; Moghimi, S. M. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 948, 13-22.



# **CAPÍTULO 5**

---

Talazoparib



## 5.1. Introducción.

Las enzimas poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARPs) son una familia de enzimas involucradas en diversos procesos celulares, tales como la reparación del ADN, la regulación de la transcripción, la apoptosis y la necrosis<sup>1-3</sup>. Específicamente, las enzimas PARP-1 y PARP-2 pertenecen a esta familia y juegan un papel crucial en la reparación de roturas de cadena simple (SSB) del ADN<sup>4, 5</sup>, cuya función es inhibida por los inhibidores de la PARP (PARPis). Estos son una familia de fármacos que han demostrado su capacidad para disminuir la proliferación de células cancerosas con mutaciones en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga (RH) del ADN, que induce una deficiencia en su reparación, como es el caso de células con mutaciones en los genes *BRCA1* o *BRCA2*<sup>6, 7</sup>. En este contexto, los PARPis provocan la muerte celular de las células deficientes en los genes *BRCA1/2* por letalidad sintética, que consiste en la formación y acumulación sistemática de roturas de cadena doble (DSB) y, finalmente, la muerte celular, puesto que estas células son incapaces de reparar este daño en el ADN por RH<sup>8</sup>. No obstante, en relación a la muerte celular provocada por la acción de los PARPis, estudios de microscopía y fluorescencia multidimensional han revelado mecanismos de sensibilidad y resistencia frente a los efectos citotóxicos de los inhibidores PARP<sup>9</sup>.

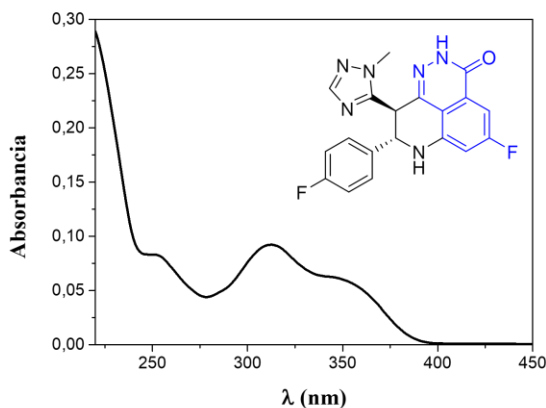
El talazoparib ((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-2,7,8,9-tetrahidro-3H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-3-ona, TLZ, Figura 36) es un inhibidor de la enzima PARP desarrollado por Pfizer y aprobado en 2018 por EE.UU. y en 2019 por la UE para el tratamiento de pacientes adultos con mutaciones *BRCA1/2* germinales con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico HER2 negativo<sup>6, 10</sup>. En este sentido, se realizó un ensayo aleatorio de fase 3 en pacientes con cáncer de mama avanzado con mutación germinal *BRCA1/2* comparando el efecto terapéutico del TLZ u otros fármacos utilizados en las terapias convencionales, revelando un beneficio significativo en el tratamiento con TLZ sobre la quimioterapia convencional<sup>11</sup>. La mejora significativa en los pacientes tratados con TLZ y el perfil de seguridad tolerable del fármaco respaldaron la incorporación

del TLZ en la rutina terapéutica contra el cáncer de mama localmente avanzado o metastásico con mutaciones *BRCA1/2* germinales<sup>12</sup>. Sin embargo, el análisis proteómico identificó las 10 proteínas que podrían ser claves para evitar la resistencia del TLZ en el tratamiento de células cancerosas de mama triple negativas<sup>13</sup>. Adicionalmente, este fármaco también se utiliza en pacientes con varios tumores sólidos<sup>14, 15</sup> y en el cáncer de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC)<sup>16</sup>. Además, se ha considerado como un nuevo candidato para el tratamiento del glioblastoma, ya que produce efectos de radiosensibilización en las células madre del cáncer de glioblastoma radioresistentes en combinación con radiación de transferencia lineal de alta energía<sup>17</sup>.

Este fármaco se administra por vía oral en forma de comprimidos y dosis de 0,25 o 1 mg. Sin embargo, existen estudios que revelan como una buena alternativa si se administra en forma de nanomedicamento por vía intraperitoneal, permitiendo así una liberación más prolongada del medicamento<sup>18</sup>. Desde un punto de vista farmacocinético, el TLZ apenas sufre alteraciones metabólicas en humanos, siendo la excreción renal su principal vía de eliminación<sup>14</sup>.

Pese a los grandes efectos terapéuticos beneficiosos del TLZ, este fármaco también presenta diversos efectos secundarios, tales como fatiga, náuseas, vómitos, diarrea, anorexia, dolor de cabeza, alopecia, trastornos de la piel, anemia, neutropenia y trombocitopenia. Entre sus efectos secundarios menos frecuentes, pero potencialmente graves, se incluyen síndromes mielodisplásicos, mielosupresión marcada y toxicidad embrionofetal<sup>10</sup>. En relación con las reacciones adversas y teniendo en cuenta que, el rucaparib, otro inhibidor de PARP, induce reacciones de fototoxicidad tal y como se ha visto en el capítulo 4<sup>19</sup>, y que el TLZ presenta una banda de absorción en la región UVA, resulta interesante investigar su fotocomportamiento y sus propiedades fotobiológicas. Para ello, se llevarán a cabo estudios *in vitro* en células de piel humanas (queratinocitos HaCaT) y, en caso de ser fototóxico, recomendar pautas de fotoprotección a los pacientes para minimizar así el riesgo de producir reacciones de fotosensibilidad por este fármaco.





**Figura 36.** Espectro de absorción del talazoparib 10 µM en PBS. Figura insertada: estructura química del talazoparib.

## 5.2. Sección experimental.

Las condiciones de cultivo celular y las medidas espectrofotométricas se realizaron de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 3.

### 5.2.1. Fotólisis en estado estacionario y aislamiento del fotoproducto.

La irradiación del TLZ (20 mg, 100 µM) se llevó a cabo en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos con lámparas UVA y agitación. A continuación, se liofilizó el crudo de reacción, se lavó con acetato de etilo (100 mL) y se filtró. Se recogió el sólido y se realizó una extracción sólido-líquido con acetato de etilo-metanol (80:20, 3×20 mL). Tras una filtración a vacío, se evaporó la fase líquida a presión reducida, proporcionando un aceite viscoso de color magenta cuya purificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de fase reversa (C18 mediterranea™ sea, 25×1 cm), una fase móvil de metanol-acetonitrilo 50:50 v:v y un flujo de 2 mL/min. El proceso de purificación fue monitorizado por detección UV a 254 nm. El fotoproducto aislado se caracterizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono, utilizando un espectrómetro Bruker Advance 400, y por espectrometría

de masas de alta resolución [HRMS (ESI-TOF), espectrómetro QTOF acoplado a una columna UPLC BEH C18 (50 mm, x 2,1 mm i.d., 1,7  $\mu$ M), fuente ESI en ionización positiva a 1,9 kV].

5-fluoro-8-(4-fluorofenil)-6-hidroxi-9-(1-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-2,7-dihidro-3H-pirido[4,3,2-de]ftalazin-3-ona (TLZ-P): RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.09 (s, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 11.6, 1H), 7.47-7.43 (m, 2H), 7.13-7.09 (m, 2H), 3.64 (s, 3H); RMN-<sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  180.3, 178.5, 167.1, 165.6, 163.2, 159.5, 152.4, 151.6, 150.6, 138.8, 136.3, 133.2, 132.5, 119.4, 118.1, 117.9, 116.2, 115.3, 98.1, 36.5, 24.2. HRMS (ESI-TOF): m/z calculada para C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [MH<sup>+</sup>] 395,1068, encontrada [MH<sup>+</sup>] 395,1064.

### 5.2.2. Ensayo de fototoxicidad *in vitro*: captación de rojo neutro (NRU).

El ensayo de captación de rojo neutro se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con ocho concentraciones crecientes de TLZ y TLZ-P que oscilaban entre 2,5 y 500  $\mu$ M y con los controles positivo (CPZ) y negativo (SDS).

Adicionalmente, dado que TLZ-P absorbe en la región del visible, se realizó otro experimento NRU irradiando con lámparas de luz visible LZC-LGR ( $\lambda_{\text{max}}$  = 520 nm, distribución gaussiana, Luzchem, Canadá) para comprobar si el fotoproducto era capaz de inducir fototoxicidad en estas condiciones. Para este propósito, se utilizó rosa de bengala (RB, 0,375 – 50  $\mu$ M) como control positivo<sup>20</sup> en lugar de CPZ, mientras que el SDS se mantuvo como control negativo.

### 5.2.3. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La detección de la actividad ROS se realizó de acuerdo con el protocolo detallado en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con TLZ (85 o 100  $\mu$ M) e irradiadas con una dosis de luz UVA de 5 J/cm<sup>2</sup> o mantenidas en oscuridad.

#### **5.2.4. Ensayo de fotooxidación de proteínas.**

La detección de la formación de proteínas carboniladas fotoinducidas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 3, donde las disoluciones de ASH se incubaron con cantidades crecientes de TLZ (0, 65, 75 o 85  $\mu\text{M}$ ) y se irradiaron con cantidades crecientes de dosis de irradiación UVA (0, 5, 10, 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) o sin irradiar.

#### **5.2.5. Ensayo cometa alcalino.**

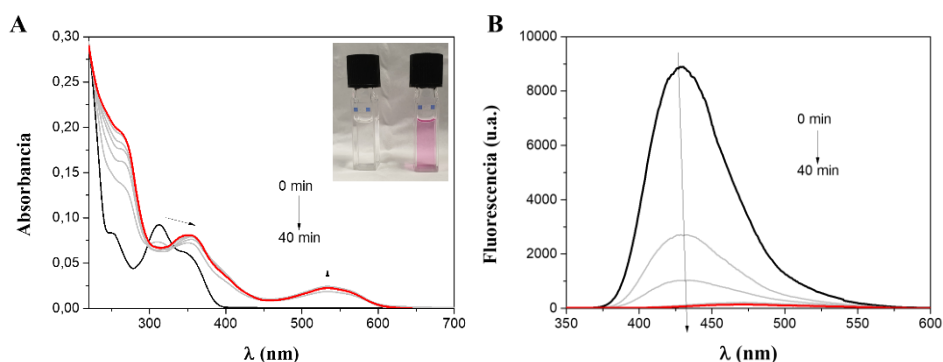
El ensayo cometa se realizó de acuerdo de acuerdo como se describe en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con cantidades crecientes de TLZ (0, 85, 100, 150 o 200  $\mu\text{M}$ ) o con el control positivo (CPZ, 5  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis de irradiación de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

Para los experimentos de recuperación, se utilizó el 5-hidroxiclofenaco (5-OH DCF, 100  $\mu\text{M}$ ) como control positivo de recuperación<sup>21</sup>.

## 5.3 Resultados y discusión.

### 5.3.1. Irradiación del talazoparib en medio acuoso.

Como se muestra en la Figura 36, el fármaco absorbe luz en la región UVA (315 – 400 nm). Dado que el 95 % de la radiación UVA presente en la luz solar no es filtrada por la capa de ozono y llega a la superficie terrestre, es de gran importancia investigar el comportamiento fotoquímico del fármaco con el objetivo de investigar la posible formación de fotoproductos y/o especies transitorias que pudiesen ser responsables de inducir fototoxicidad en la piel. Así, se irradió una disolución de TLZ (20  $\mu\text{M}$  en PBS) en un fotorreactor equipado con lámparas UVA centradas a  $\lambda = 350$  nm. El proceso se monitorizó mediante espectroscopías de absorción (Figura 37A) y de fluorescencia (Figura 37B) a tiempos de irradiación crecientes.



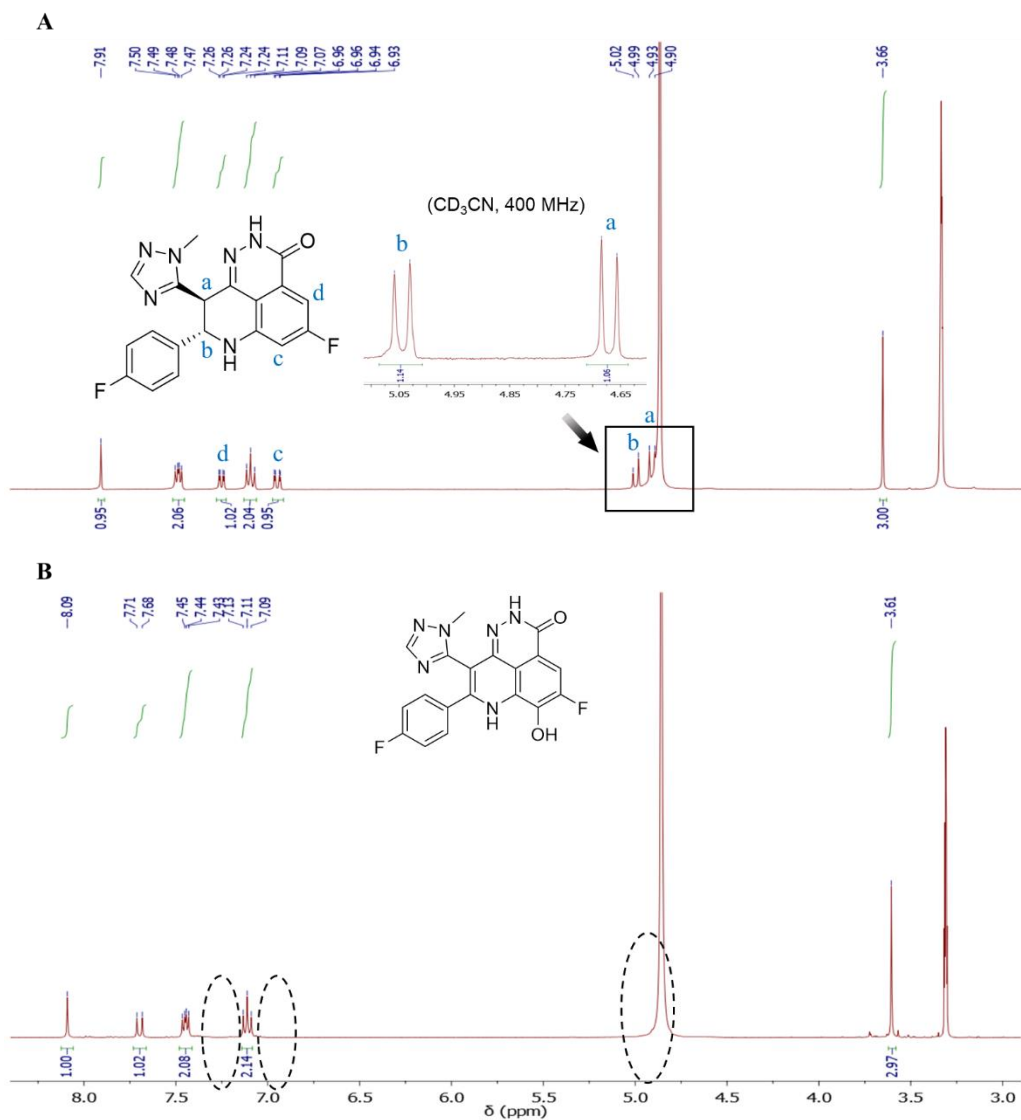
**Figura 37.** Cambios en los espectros del talazoparib (20  $\mu\text{M}$  en PBS) tras su irradiación a  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, de 0 (traza negra) a 40 min (traza roja). **A:** espectros de absorción. **B:** espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm). Figura insertada: disolución de TLZ en PBS antes de irradiarse (izquierda) y tras 40 min de irradiación (derecha).

Por un lado, en las medidas de absorción, el espectro del TLZ previo a la irradiación (traza negra) exhibió dos máximos a  $\lambda = 310$  y  $\lambda = 350$  nm que desaparecieron tras 40 min de irradiación a la vez que apareció una nueva banda con un máximo a  $\lambda = 540$  nm y alcanzando los 610 nm (traza roja). Este cambio fue apreciable a simple

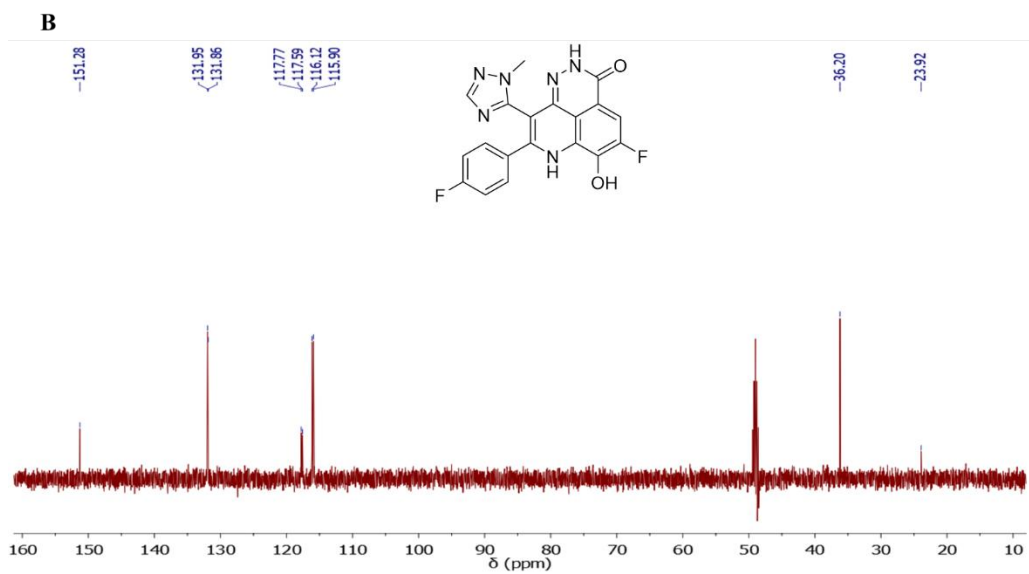
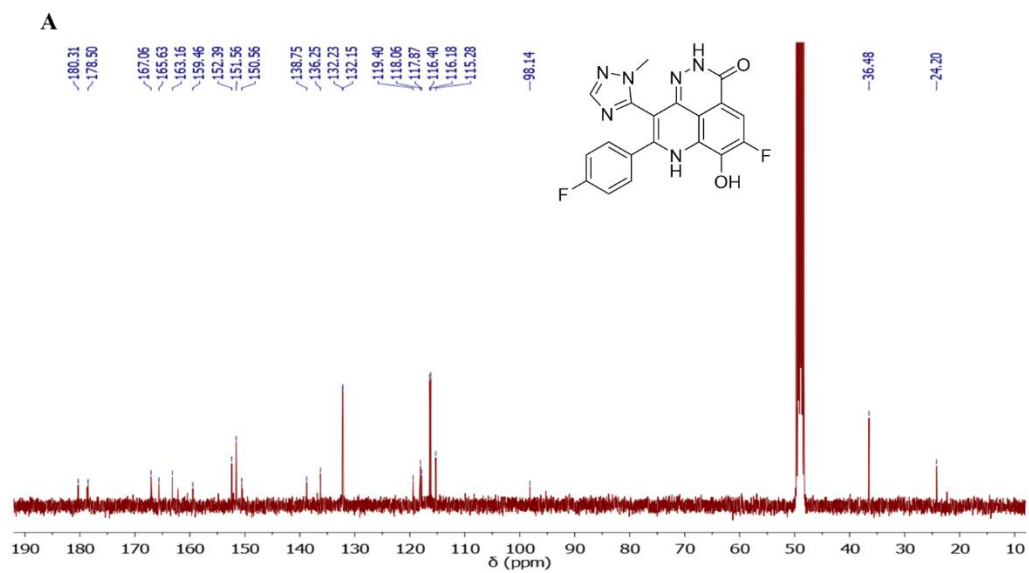
vista (Figura 37A, figura insertada), ya que pasó de ser una disolución incolora a ser rosa, sugiriendo así la aparición de un nuevo fotoproducto.

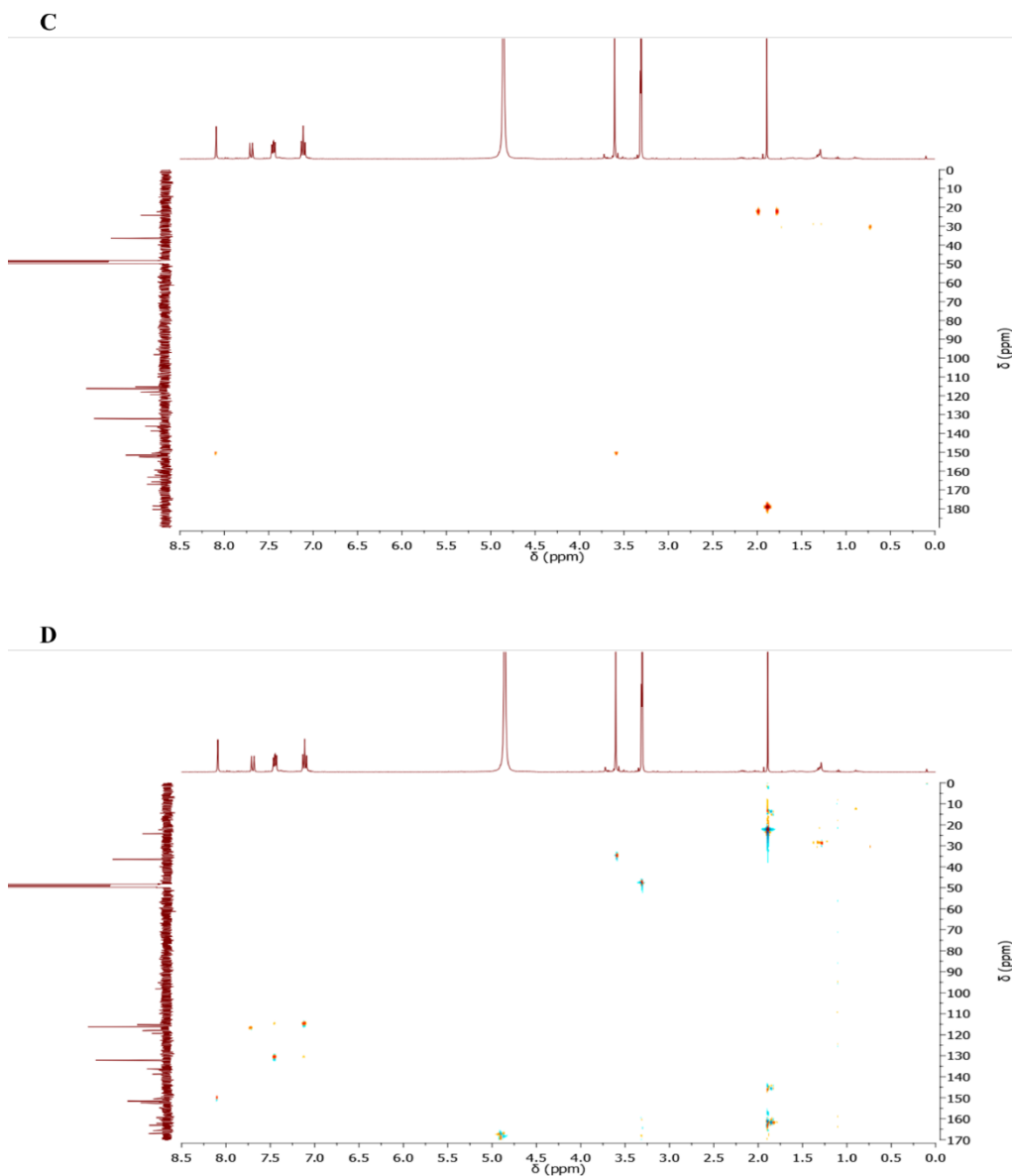
Por otro lado, también se observaron cambios significativos en los espectros de fluorescencia, donde la intensidad de fluorescencia de la banda inicial del TLZ centrada a  $\lambda = 440$  nm disminuyó a medida que aumentaba el tiempo de irradiación (trazas grises), hasta volverse prácticamente insignificante a los 40 minutos de tiempo de irradiación (traza roja).

Por tanto, con el fin de investigar si se había formado algún fotoproducto estable, se realizó una irradiación a escala preparativa. Así, se suspendieron 20 mg de TLZ en 200 mL de PBS y se irradiaron durante 30 minutos con agitación en el fotorreactor ( $\lambda_{exc} = 350$  nm). Tras una filtración a vacío para eliminar el TLZ que no había reaccionado, se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo-metanol (80:20) y una posterior evaporación del disolvente. El crudo resultante se purificó por HPLC (1:1 CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>3</sub>CN como eluyente), dando lugar a un único fotoproducto (TLZ-P) como un sólido rojizo. El espectro HRMS obtenido por ESI mostró un pico MH<sup>+</sup> a 395,1064 uma, que corresponde a M = C<sub>19</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>. Este incremento de 14 uma respecto al TLZ de partida (MH<sup>+</sup> = 381,1191, M = C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O) coincide con la pérdida de 2 hidrógenos y la incorporación de 1 oxígeno. Así, para elucidar la estructura de TLZ-P se realizaron experimentos de RMN-<sup>1</sup>H en CD<sub>3</sub>OD y, comparando los espectros de fármaco de partida y su fotoproducto (Figura 38A y Figura 38B, respectivamente) se observaron los siguientes cambios: i) las señales correspondientes a H<sub>a</sub> y H<sub>b</sub> en  $\delta = 4,90$  y  $\delta = 5,02$  ppm del TLZ no están presentes en el espectro del TLZ-P, lo que sugiere la presencia de un doble enlace entre C<sub>a</sub> y C<sub>b</sub>; ii) los dos dobles dobles de H<sub>c</sub> y H<sub>d</sub> en TLZ ( $\delta = 6,95$  y  $\delta = 7,25$  ppm) desaparecen en el espectro del TLZ-P y, en su lugar, se observó un doblete a  $\delta = 7,72$  ppm, hecho que concuerda con la adición de un grupo hidroxilo en C<sub>c</sub> o C<sub>d</sub> y, a partir de los acoplamientos observados en los espectros bidimensionales de HSQC y HMBC (Figura 39C y Figura 39D), se propuso la estructura química del TLZ-P.



**Figura 38.** Espectros RMN-<sup>1</sup>H del TLZ (A) y de su fotoproducto (B) en CD<sub>3</sub>OD. Las señales clave están indicadas en la estructura química del TLZ. Figura insertada: Detalle de las señales H<sub>a</sub> y H<sub>b</sub> en CD<sub>3</sub>CN.

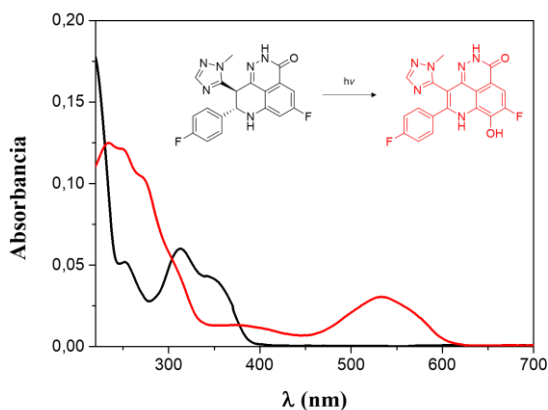




**Figura 39.** Espectros de RMN del TLZ-P en  $\text{CD}_3\text{OD}$ : **A** RMN- $^{13}\text{C}$ , **B** DEPT, **C** HSQC, **D** HMBC.



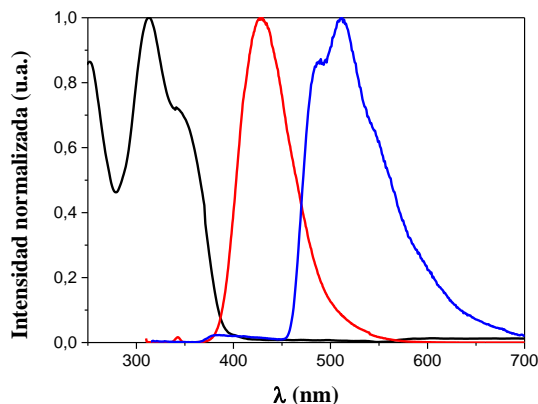
Teniendo en cuenta que TLZ-P es un fotoderivado estable del TLZ que extiende su banda de absorción a la región del visible (Figura 40), resultó de interés investigar su posible participación en el daño fotoinducido mostrado por el fármaco original.



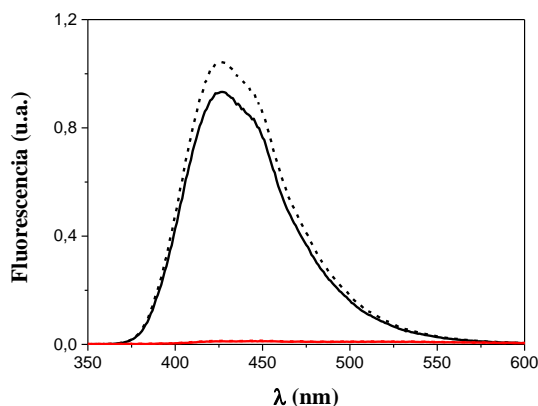
**Figura 40.** Espectros de absorción del talazoparib (TLZ, traza negra) y del fotoproducto del talazoparib (TLZ-P, traza roja) a 10  $\mu$ M en PBS. Figura insertada: fotoconversión del TLZ en su fotoproducto TLZ-P en medio acuoso.

### 5.3.2. Propiedades fotofísicas.

Los espectros normalizados de absorción y fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 305$  nm) del TLZ en PBS se muestran en la Figura 41 (trazas negra y roja, respectivamente), donde la energía del primer estado excitado singlete ( $E_s$ ), obtenido a partir de la intersección entre ambos espectros, resultó ser de 74 kcal/mol. Además, el rendimiento cuántico de fluorescencia del TLZ ( $\phi_F$ ) fue de 0,12 en PBS y 0,10 en células, utilizando antraceno como estándar<sup>22</sup>(Figura 42).



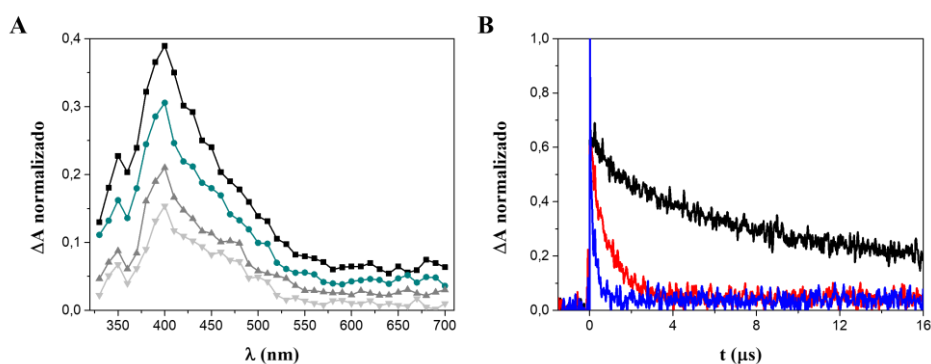
**Figura 41.** Espectros normalizados del TLZ: excitación (traza negra) en PBS a temperatura ambiente, fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 305$  nm, traza roja) en PBS a temperatura ambiente y fosforescencia ( $\lambda_{exc} = 300$  nm, traza azul) en etanol a 77 K.



**Figura 42.** Espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) de disoluciones isoabsortivas de TLZ (traza negra) y TLZ-P (traza roja). Las líneas discontinuas corresponden a disoluciones en PBS y las líneas continuas a la internalización en células HaCaT.

El espectro de fosforescencia normalizado del fármaco, realizado a 77 K en matriz de etanol, mostró una banda con un máximo a  $\lambda = 512$  nm (Figura 41, traza azul). A partir del 30 % del aumento de la banda, se determinó la energía del primer estado excitado triplete ( $E_T$ ), cuyo valor fue de 61,2 kcal/mol, utilizando benzofenona como

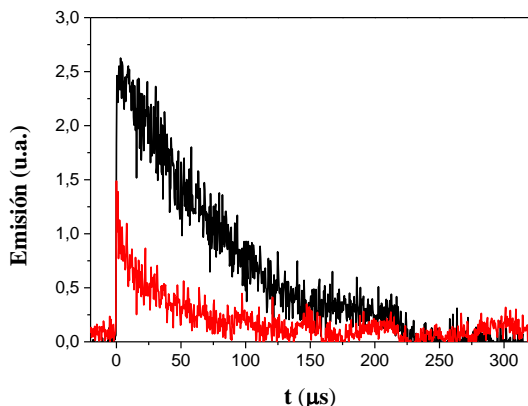
referencia<sup>23</sup>. Mediante experimentos de fotólisis de destello láser, se registró el espectro de absorción transitoria del TLZ (55  $\mu\text{M}$  en PBS,  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\text{N}_2$ ), obteniéndose una banda principal centrada a  $\lambda = 400 \text{ nm}$  (Figura 43A) que se desactivaba en presencia de oxígeno, atribuyéndose así al estado excitado triplete, (Figura 43B). El valor del tiempo de vida del triplete ( $\tau_T$ ) en atmósfera de  $\text{N}_2$  obtenido por un ajuste monoexponencial decreciente fue de 8,8  $\mu\text{s}$  y, a partir de los experimentos realizados en oxígeno, aire y  $\text{N}_2$  permitieron obtener la constante de desactivación por oxígeno,  $k_q(\text{O}_2) = 3,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Figura 43.** Fotólisis de destello láser del talazoparib (55  $\mu\text{M}$ , PBS) a  $\lambda = 355 \text{ nm}$ . **A:** Espectro de absorción transitoria a diferentes escalas de tiempo en  $\text{N}_2$  (desde 0,5  $\mu\text{s}$  hasta 12  $\mu\text{s}$ ). **B:** cinéticas de desactivación monitorizadas a  $\lambda = 400 \text{ nm}$  en nitrógeno (traza negra), aire (traza roja) y oxígeno (traza azul).

Se sabe que un estado excitado triplete suele considerarse como el principal precursor de la formación de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$  o  $^1\Delta_g$ ) a través de un proceso de transferencia de energía hacia el oxígeno molecular conocido como mecanismo de oxidación de Tipo II<sup>24</sup>. Una vez formado, el  $^1\text{O}_2$  es capaz de originar daño oxidativo en las biomoléculas del interior de las células, incluyendo oxidación de proteínas<sup>25</sup> y nucleósidos<sup>26</sup>. Con el fin de investigar la formación de esta especie reactiva del oxígeno, se registró la formación de  $^1\text{O}_2$  mediante medidas de luminiscencia de tiempo resuelto a 1270 nm en acetonitrilo tras la excitación del TLZ con el láser a 355 nm (Figura 44), utilizando tetrametil-*p*-benzoquinona (DQ) como referencia ( $\phi_{\Delta}$

= 0,89;  $\tau_{\Delta} \sim 65 \mu\text{s}$  en MeCN)<sup>27</sup>. Como resultado, TLZ mostró capacidad para generar  $^1\text{O}_2$  con un  $\phi_{\Delta} = 0,54$  y un tiempo de vida aproximado de  $38 \mu\text{s}$  en MeCN.



**Figura 44.** Experimentos de tiempo resuelto a 1270 nm tras excitación a 355 nm de disoluciones aireadas de TLZ (traza roja) en MeCN para la detección de  $^1\text{O}_2$ . Se utilizó tetrametil-*p*-benzoquinona (DQ, traza negra) como referencia.

Las principales propiedades fotofísicas del TLZ se recogen en la Tabla 8, donde, a diferencia del fármaco original, se observa que TLZ-P no mostró fluorescencia (Figura 42) y no se detectaron señales en los experimentos de fotólisis de destello láser. Este hecho sugiere que el fotoproducto podría ser un compuesto con un elevado perfil de fotoseguridad. Para corroborar esta hipótesis, se realizó un ensayo de NRU *in vitro* con el fotoproducto.

**Tabla 8.** Principales propiedades fotofísicas del talazoparib.

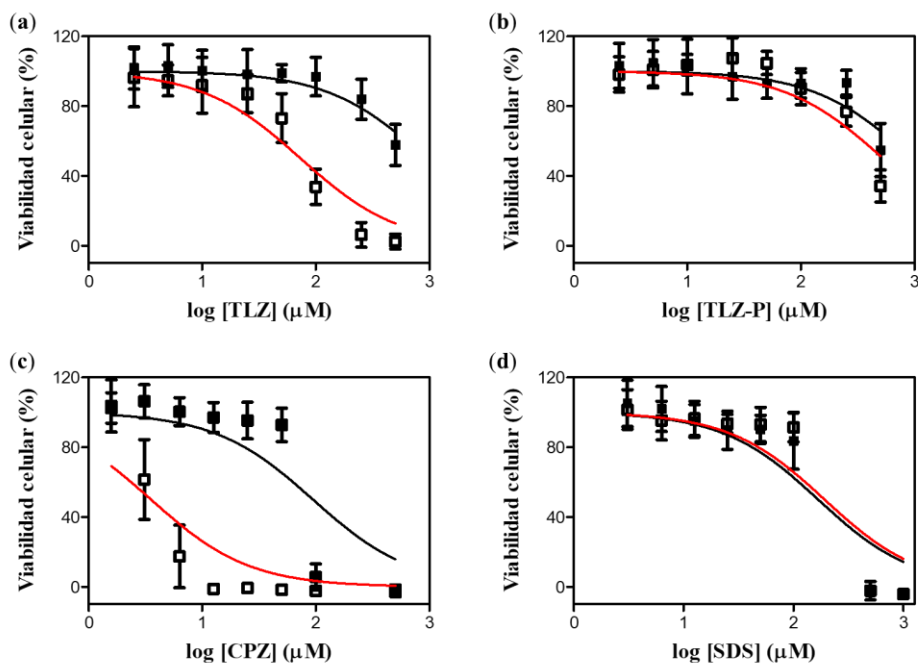
$\lambda_{\max \text{ abs}}$ (nm) <sup>a, b</sup>	250, 320, 350
$\lambda_{\max \text{ em}}$ (nm) <sup>a, c</sup>	440
$E_s$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	74,0
$\phi_F$ <sup>a</sup>	0,12
$\tau_F$ (ns) <sup>a</sup>	< 1 ns
$\lambda_{\max \text{ em}}$ (nm) <sup>d, e</sup>	512
$E_T$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	61,2
$\tau_T$ ( $\mu$ s) <sup>a</sup>	8,8
$\lambda_{\max \text{ abs}}$ (nm) <sup>f, g</sup>	400
$k_q$ (O <sub>2</sub> ) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>f, g</sup>	$3,6 \times 10^9$
$\phi_\Delta$ <sup>h</sup>	0,54
$\tau_\Delta$ ( $\mu$ s) <sup>h</sup>	38

<sup>a</sup> 20  $\mu$ M, PBS, T<sub>amb</sub>, aire; <sup>b</sup> espectroscopía de absorción; <sup>c</sup> espectroscopía de fluorescencia; <sup>d</sup> 50  $\mu$ M, etanol, 77K, air; <sup>e</sup> espectroscopía de fosforescencia; <sup>f</sup> espectroscopía de absorción transitoria; <sup>g</sup> 55  $\mu$ M, PBS, T<sub>amb</sub>, N<sub>2</sub>; <sup>h</sup> detectado por luminiscencia a 1270 nm, 180  $\mu$ M, MeCN, T<sub>amb</sub>, aire.

### 5.3.3. Estudios de fototoxicidad *in vitro*.

#### *Ensayo de captación de rojo neutro.*

En primer lugar, a partir de las curvas de dosis-respuesta obtenidos, se calcularon los valores del factor fotoirritante (PIF) de TLZ y TLZ-P a partir de los ensayos de viabilidad celular de queratinocitos humanos (HaCaT) tratadas con cantidades crecientes de fármaco o fotoproducto, utilizando rojo neutro como indicador de viabilidad celular, en condiciones de oscuridad o luz UVA ( $\lambda = 350$  nm, dosis de irradiación = 5 J/cm<sup>2</sup>). Los valores de PIF de los controles positivo (clorpromazina, CPZ) y negativo (dodecilsulfato sódico, SDS) se calcularon en las mismas condiciones para garantizar la fiabilidad de los resultados.

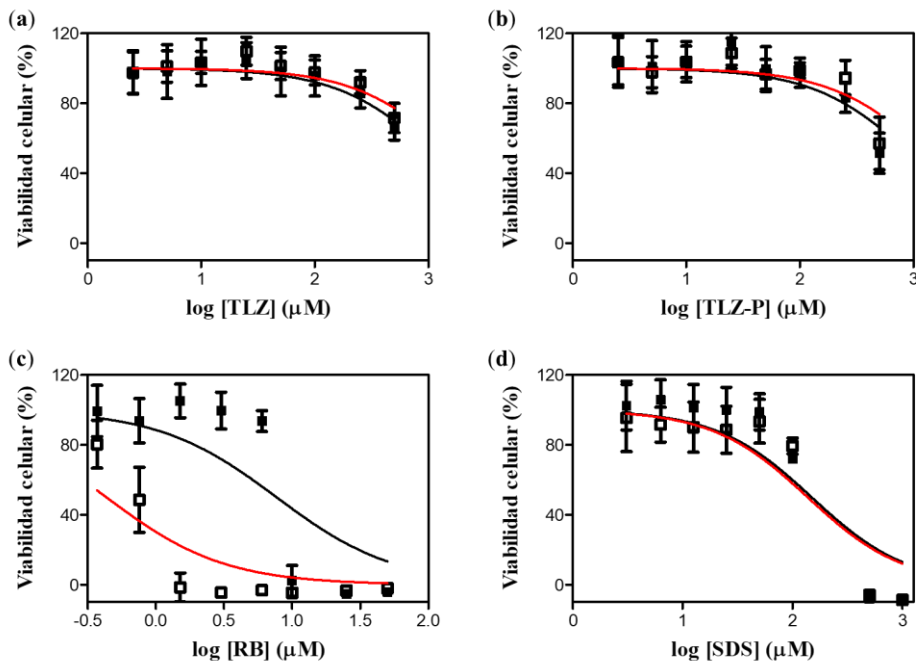


**Figura 45.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células HaCaT tratadas con talazoparib (TLZ, **a**), su fotoproducto (TLP-Z, **b**), clorpromazina (CPZ, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia (□) o ausencia (■) de luz UVA (5 J/cm<sup>2</sup>), donde CPZ y SDS se utilizaron como controles positivo y negativo de fototoxicidad, respectivamente. Los datos representan la media ± s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Los valores de IC<sub>50</sub> de TLZ y TLZ-P se determinaron a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta (Figura 45) a  $\lambda_{exc} = 350$  nm. El valor PIF del TLZ fue de 7, con un IC<sub>50</sub> en oscuridad de > 500  $\mu$ M (se fijó la concentración más alta ensayada dado que no fue posible obtener un valor de IC<sub>50</sub> en las condiciones del experimento) y un IC<sub>50</sub> en luz UVA de  $76 \pm 14$   $\mu$ M que, de acuerdo con las directrices de la OECD 432 (2019)<sup>28</sup>, el fármaco puede considerarse fototoxicidad. Sin embargo, para su fotoproducto, tal y como se esperaba, tanto los valores de IC<sub>50</sub> en oscuridad como en luz UVA resultaron ser superiores a 500  $\mu$ M, con un valor PIF cercano a 1, Dado que este nuevo compuesto también absorbe luz en la región del visible (hasta 600 nm, véase Figura 40), su ensayo NRU también se realizó a  $\lambda_{exc} = 520$  nm, utilizando rosa de bengala (RB) como control positivo en lugar de CPZ, ya que este último

compuesto no absorbe a esta longitud de onda. A partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta (Figura 46) se obtuvo nuevamente un valor PIF de 1, indicando que este compuesto tampoco es fototóxico en estas condiciones.

Los valores de  $IC_{50}$  del TLZ y del TLZ-P obtenidos tanto en oscuridad como tras irradiación con luz UVA o visible, así como los valores PIF, se recogen en la Tabla 9.



**Figura 46.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células HaCaT tratadas con talazoparib (TLZ, **a**), su fotoproducto (TLP-Z, **b**), rosa de bengala (RB, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia (□) o ausencia (■) de luz visible ( $5 \text{ J/cm}^2$ ), donde RB se utilizó como control positivo y SDS y TLZ se utilizaron como controles negativos de fototoxicidad. Los datos representan la media  $\pm$  s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

**Tabla 9.** Ensayo de fototoxicidad HaCaT NRU *in vitro* de TLZ y TLZ-P realizado con diferentes fuentes de irradiación.

<i>Ensayo NRU realizado a <math>\lambda_{exc} = 350</math> nm.</i>				<i>Ensayo NRU realizado a <math>\lambda_{exc} = 520</math> nm.</i>			
Compuesto	IC <sub>50</sub> (osc)	IC <sub>50</sub> (UVA)	PIF <sup>1</sup>	Compuesto	IC <sub>50</sub> (osc)	IC <sub>50</sub> (visible)	PIF
CPZ	94 ± 30	4 ± 1	24	RB	8 ± 3	0.4 ± 0.1	20
SDS	168 ± 46	192 ± 53	1	SDS	150 ± 65	138 ± 50	1
TLZ	> 500	76 ± 14	7	TLZ	> 500	> 500	1
TLZ-P	> 500	> 500	1	TLZ-P	> 500	> 500	1

Los datos corresponden con la media ± s de cuatro experimentos realizados en triplicado. <sup>1</sup>De acuerdo con las directrices de la OECD 432 (2019), PIF < 2 indica “no fototoxicidad”, 2 < PIF < 5 indica “fototoxicidad probable” y PIF > 5 indica “fototoxicidad”.

Los datos recopilados en la Tabla 9 sugieren que, aunque el fármaco original es fototóxico, su fototransformación en medio acuoso da lugar a un derivado no reactivo frente a la luz UVA. Además, los experimentos a  $\lambda = 520$  nm revelaron que TLZ-P tampoco es fototóxico cuando se irradia con luz visible. Por ello, de ahora en adelante los experimentos *in vitro* solo se realizarán para el TLZ.

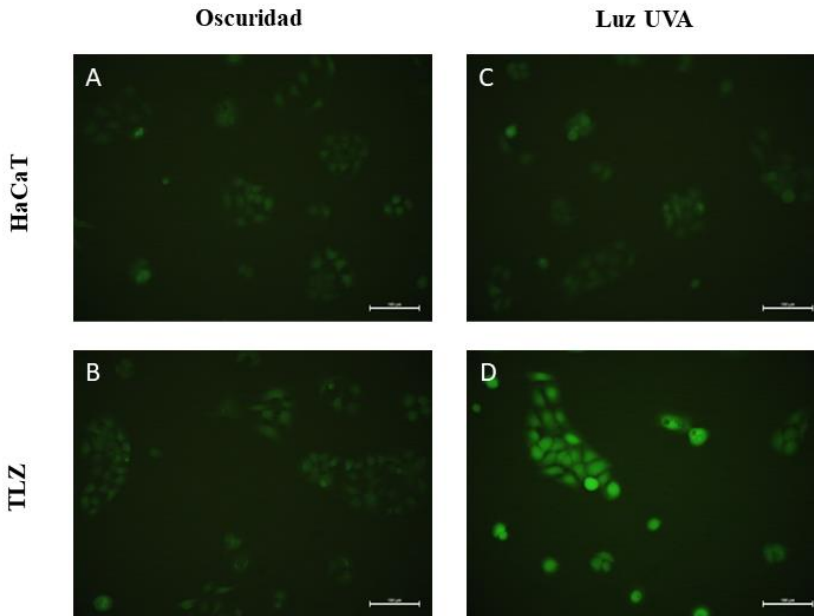
Dado que la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) suele ser el origen de la oxidación de biomoléculas y/o membranas celulares, el siguiente paso fue investigar la generación de ROS tras la irradiación del fármaco con luz UVA.

#### *Generación de especies reactivas de oxígeno.*

Para la detección de las ROS, se sembraron células HaCaT en placas de 12 pocillos y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de TLZ (0, 85 y 100  $\mu$ M), manteniéndose en condiciones de oscuridad o de irradiación UVA (dosis de luz = 5 J/cm<sup>2</sup>). Seguidamente, tras la tinción de las células con 25  $\mu$ M de diacetato de 2’7’-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA), se registró la fluorescencia de todas las muestras mediante microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro de fluoresceína FITC. En la Figura 47 mostrada a continuación, las imágenes A y B corresponden a



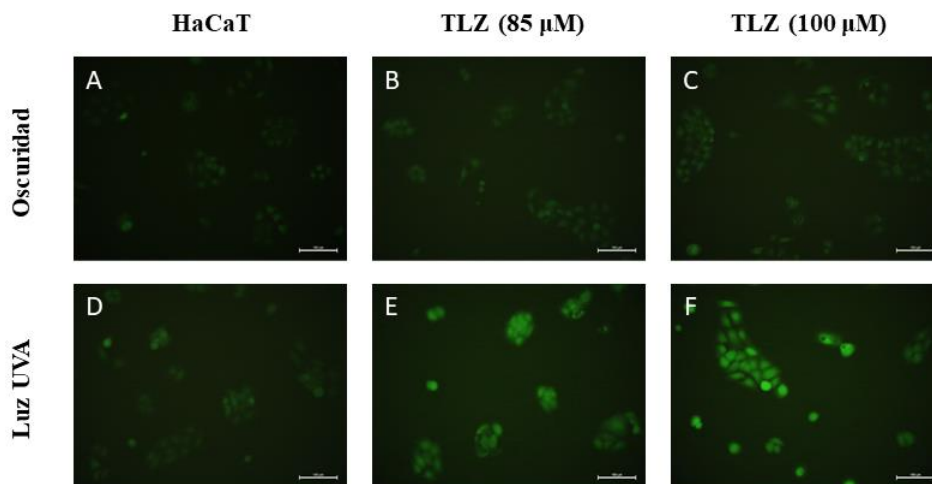
las muestras no irradiadas, mientras que las imágenes C y D se obtuvieron tras irradiación.



**Figura 47.** Experimentos ROS con talazoparib (TLZ, 100  $\mu\text{M}$ ). Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia, utilizando un filtro de fluoresceína FITC. Los queratinocitos (HaCaT) fueron incubados en ausencia (A, C) o presencia (B, D) de TLZ, mantenidos en oscuridad (A, B) o irradiados (C, D) con luz UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Todas las muestras fueron tratadas con diacetato de 2'7-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ) 25  $\mu\text{M}$ .

Así, en presencia de TLZ (B) la fluorescencia obtenida fue insignificante y similar a la registrada en ausencia de fármaco (A), indicando la no formación de ROS en estas condiciones, lo que concuerda con su valor de  $\text{IC}_{50}$  en oscuridad (> 500  $\mu\text{M}$ ) obtenido en el ensayo de NRU. Por el contrario, las células tratadas con TLZ e irradiadas con luz UVA emitieron fluorescencia (D), indicando la capacidad del TLZ de generar ROS tras la irradiación UVA. Como era de esperar, el experimento control realizado con las células irradiadas en ausencia del fármaco (C) no dio ningún resultado positivo.

En la Figura 48 se muestra el experimento utilizando cantidades crecientes de TLZ, donde se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda fluorescente a mayor concentración de TLZ, indicando que existía una relación directa entre la concentración del fármaco y la generación de las ROS detectada por fluorescencia.

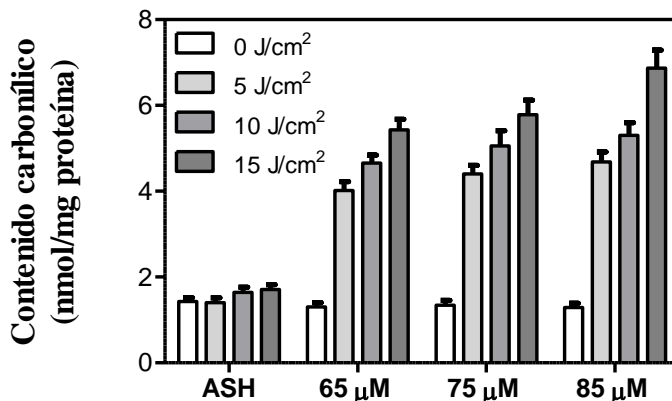


**Figura 48.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de los experimentos ROS con TLZ (85, 100  $\mu$ M). Se incubaron queratinocitos humanos (HaCaT) en ausencia (A, D) o presencia (B, C, E, F) de TLZ, mantenidos en oscuridad (A, B, C) o irradiados (D, E, F) con luz UVA (5 J/cm<sup>2</sup>). Todas las muestras fueron tratadas con diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) 25  $\mu$ M.

#### *Evaluación de la fotooxidación a proteínas.*

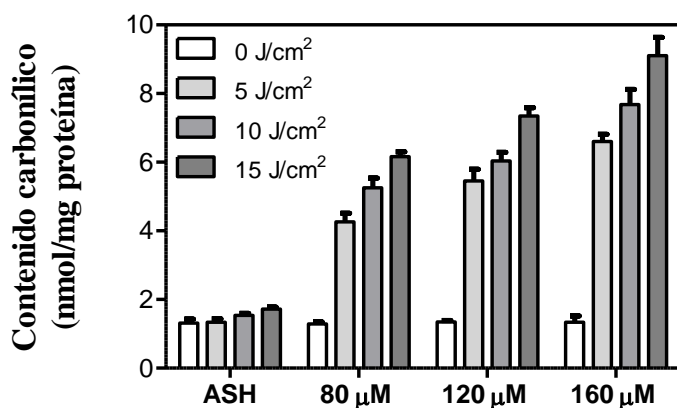
Dado que el talazoparib se une eficientemente a las proteínas plasmáticas y que la modificación oxidativa que se produce con más frecuencia, y generalmente de forma irreversible en las proteínas es la carbonilación, se utilizó la albúmina sérica humana (ASH) como proteína modelo para determinar el contenido carbonílico de sistemas TLZ/ASH, siendo la presencia de estos grupos carbonílicos un posible biomarcador de daño oxidativo. De esta forma, se irradiaron disoluciones de PBS que contenían ASH (0,075  $\mu$ M) y TLZ (0, 65, 75 o 85  $\mu$ M) con diferentes dosis de luz UVA (0, 5, 10

y 15 J/cm<sup>2</sup>) y posteriormente se midió el contenido carbonílico de todas las condiciones.



**Figura 49.** Fotooxidación de proteínas por talazoparib. El contenido carbonílico fue determinado mediante el método de derivatización de la DNPH. Condiciones: ASH (0,075 μM), TLZ: 65, 75 o 85 μM, dosis de irradiación (escala de grises): 0 (□), 5 (▨), 10 (▩) o 15 (■) J/cm<sup>2</sup>. Los datos representan la media ± s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La Figura 49 muestra que el contenido de carbonilos de los sistemas TLZ/ASH aumentó significativamente tras la irradiación con luz UVA, hasta prácticamente cuadruplicar su valor con respecto a la muestra no irradiada, lo que evidencia la capacidad del fármaco para fotooxidar a las proteínas de las membranas celulares. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el test de NRU, donde TLZ resultó ser fototóxico con un IC<sub>50</sub> UVA de 76 μM. Adicionalmente, se realizó una nueva tanda de experimentos a concentraciones más altas de TLZ (80 μM, 120 μM, 160 μM), cuyo resultado se muestra en la Figura 50.



**Figura 50.** Fotooxidación de proteínas por TLZ. El contenido carbonílico fue determinado utilizando el método de derivatización de la DNPH. Condiciones: ASH: 0,075 μM, TLZ: 80, 120 o 160 μM, dosis de irradiación (escala de grises): 0 (□), 5 (▨), 10 (▩) o 15 (■) J/cm<sup>2</sup>. Los datos representan la media ± s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Teniendo en cuenta que la absorción de la ASH en la región del UVA es prácticamente despreciable, el contenido carbonílico de las muestras de ASH sin fármaco se mantuvo constante con independencia de la dosis de irradiación empleada, lo que indica la idoneidad de las dosis de irradiación UVA manejadas en este experimento para evitar falsos positivos.

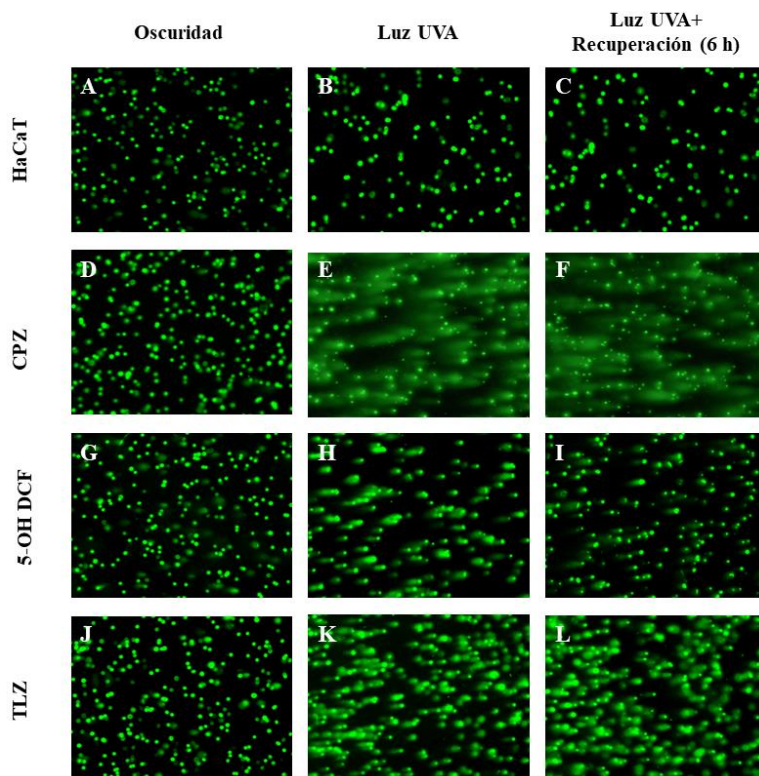
*Evaluación de la fotogenotoxicidad mediante por el ensayo cometa.*

La fotogenotoxicidad inducida por TLZ se evaluó mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas, el cual revela roturas de cadena simple (SSB), dobles (DSB) y sitios alcalinos lábiles en el ADN de células individuales<sup>29</sup>. Para este propósito, las células HaCaT se incubaron con TLZ 85 μM durante 30 minutos y se irradiaron durante 16 minutos con luz UVA, equivalentes a una dosis de 5 J/cm<sup>2</sup>. El lisado resultante se embebió en agarosa sobre un portaobjetos y se realizó una electroforesis en condiciones alcalinas, permitiendo así migrar el ADN dañado y fragmentado del núcleo. Tras la tinción con SYBR® Gold, se analizó la fluorescencia de los nucleoides y las colas de ADN mediante microscopía de fluorescencia ( $\lambda_{exc} =$

495 nm,  $\lambda_{em} = 537$  nm), utilizando el filtro de fluoresceína FITC. Finalmente, el porcentaje de daño al ADN se calculó utilizando la escala de valoración visual<sup>30</sup> de al menos 100 cometas.

Dado que la muerte celular puede promover en cierta medida la fragmentación del ADN mediante la activación de las ADNasas activadas por caspasas (CADs), se comprobó la viabilidad celular tras la irradiación mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán<sup>31</sup> para evitar falsos positivos. La tasa de viabilidad obtenida fue superior al 85 %, indicando la idoneidad tanto de la dosis UVA como la concentración de TLZ empleadas<sup>32, 33</sup>.

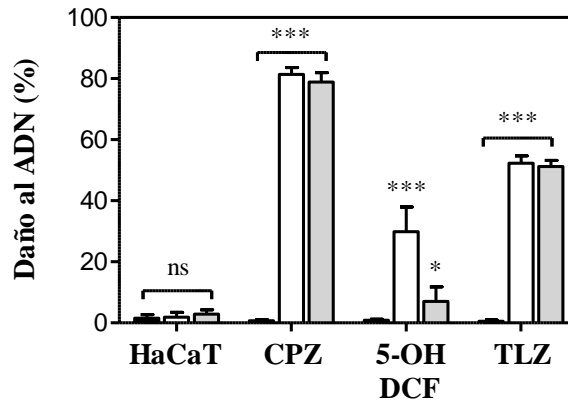
Para comprobar si las células eran capaces de recuperar ese daño al ADN, se llevó a cabo un ensayo de recuperación, utilizándose 5-OH DCF como control positivo de recuperación.



**Figura 51.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de los experimentos del ensayo cometa de recuperación. Los queratinocitos (HaCaT) se incubaron solos (A, B, C), en presencia de CPZ 5  $\mu$ M (D, E, F), 5-OH DCF 100  $\mu$ M (G, H, I) o TLZ 85  $\mu$ M (J, K, L) en oscuridad (A, D, G, J), tras irradiación UVA (B, E, H, K) o tras irradiación UVA seguida de un periodo de recuperación celular de 6 h (C, F, I, L).

Los resultados del ensayo de recuperación se muestran en la Figura 51, donde las células HaCaT se incubaron solas (A, B, C), en presencia de CPZ (D, E, F), de 5-OH DCF (G, H, I) o TLZ (J, K, L); A, D, G, J corresponden con las muestras no irradiadas, mientras que B, E, H, K se obtuvieron tras la irradiación y C, F, I, L corresponden a las irradiadas y posterior recuperación. Por un lado, no se observaron diferencias entre las muestras no irradiadas (A, D, G, J), lo que indica que no se detectó daño alguno al ADN, mientras que, por otro lado, TLZ en combinación con luz UVA (K) sí mostro un daño significativo a las células

(aproximadamente de 55 %, Figura 52) en comparación con los controles negativo (B) y positivo (E). Cabe destacar que, en comparación con el control positivo de recuperación (I), no se observó una reducción en el daño del ADN nuclear tras 6 h de recuperación (L), lo que indicó que el daño al ADN es irreversible.



**Figura 52.** Ensayo cometa realizado en condiciones alcalinas. Porcentaje de daño al ADN por recuento visual de células sin tratar (HaCaT) o tratadas con clorpromazina (CPZ, 5  $\mu$ M) 5-hidroxiclofenaco (5-OH DCF, 100  $\mu$ M) o talazoparib (TLZ, 85  $\mu$ M) en oscuridad (■), tras irradiación UVA (5 J/cm<sup>2</sup>, □) o tras irradiación UVA + 6 h de recuperación (□). Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas por el test t-Student (ns: no significativo, \* $p$  < 0,05, \*\*\* $p$  < 0,001).

## 5.4. Conclusiones.

Este capítulo se ha centrado en investigar el perfil de fotoseguridad del inhibidor de las PARP-1/2 talazoparib. Para ello, se han llevado a cabo irradiaciones en estado estacionario, estudios fotofísicos y ensayos celulares *in vitro*. Así, tras la irradiación UVA, se ha visto que TLZ se fotooxida a TLZ-P, un fotoproducto que extiende su banda de absorción a la región del visible y que, además, cambia de color de incoloro a rosa. La segunda gran diferencia entre ambos compuestos se pudo apreciar gracias al estudio de las propiedades fotofísicas, a partir del cual se caracterizaron los estados excitados singlete y triplete del fármaco, mientras que en el fotoproducto no se detectó ni señal de fluorescencia ni señal de absorción transitoria. Estos hechos quedaron de manifiesto cuando se evaluó el potencial fototóxico de ambos compuestos, ya que, a partir de los ensayos de captación de rojo neutro, el valor PIF del TLZ fue de 7, mientras que el de TLZ-P fue 1, al irradiar tanto en la región UVA como en la región del visible. Por tanto, se puede concluir que, a diferencia de su fotoproducto, el fármaco sí es un compuesto fototóxico.

Esta fototoxicidad quedó patente cuando, por medio de la fluorescencia registrada de la diclorofluoresceína en queratinocitos expuestos al TLZ tras irradiación UVA, se observó la generación *in vitro* de especies reactivas de oxígeno, las cuales podrían ser las responsables del daño oxidativo fotoinducido hacia las principales dianas celulares. Además, se generó un fotodaño al ADN irreversible, que podría dar lugar a mutaciones que, en última instancia, podría generar fotocarcinogénesis.

Por tanto, los resultados objetivos evidencian que el TLZ es un fármaco foto(geno)tóxico, siendo necesario recomendar pautas de fotoprotección a los pacientes en tratamiento con este fármaco para minimizar así el potencial fotosensibilizante del fármaco.



## 5.5. Bibliografia.

1. Herceg, Z.; Wang, Z.-Q. *Mutat. Res.* **2001**, *477* (1), 97-110.
2. Vyas, S.; Chesarone-Cataldo, M.; Todorova, T.; Huang, Y. H.; Chang, P. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2240.
3. Langelier, M.-F.; Eisemann, T.; Riccio, A. A.; Pascal, J. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *53*, 187-198.
4. Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18* (10), 610-621.
5. Ménissier de Murcia, J.; Ricoul, M.; Tartier, L.; Niedergang, C.; Huber, A.; Dantzer, F.; Schreiber, V.; Amé, J. C.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Sabatier, L.; Chambon, P.; de Murcia, G. *EMBO J.* **2003**, *22* (9), 2255-2263.
6. Wang, B.; Chu, D.; Feng, Y.; Shen, Y.; Aoyagi-Scharber, M.; Post, L. E. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (1), 335-357.
7. Cortesi, L.; Rugo, H. S.; Jackisch, C. *Target. Oncol.* **2021**, *16* (3), 255-282.
8. Lord, C. J.; Ashworth, A. *Science* **2017**, *355* (6330), 1152-1158.
9. Michelena, J.; Lezaja, A.; Teloni, F.; Schmid, T.; Imhof, R.; Altmeyer, M. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 2678.
10. Hoy, S. M. *Drugs* **2018**, *78* (18), 1939-1946.
11. Litton, J. K.; Rugo, H. S.; Ettl, J.; Hurvitz, S. A.; Gonçalves, A.; Lee, K.-H.; Fehrenbacher, L.; Yerushalmi, R.; Mina, L. A.; Martin, M.; Roché, H.; Im, Y.-H.; Quek, R. G. W.; Markova, D.; Tudor, I. C.; Hannah, A. L.; Eiermann, W.; Blum, J. L. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379* (8), 753-763.
12. Hurvitz, S. A.; Gonçalves, A.; Rugo, H. S.; Lee, K. H.; Fehrenbacher, L.; Mina, L. A.; Diab, S.; Blum, J. L.; Chakrabarti, J.; Elmeliogy, M.; DeAnnuntis, L.; Gauthier, E.; Czibere, A.; Tudor, I. C.; Quek, R. G. W.; Litton, J. K.; Ettl, J. *The oncologist* **2020**, *25* (3), e439-e450.

13. Guneş Eskiler, G.; Yanar, S.; Akpınar, G.; Kasap, M. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2021**, 35 (3), e22678.
14. Yu, Y.; Chung, C. H.; Plotka, A.; Quinn, K.; Shi, H.; Pápai, Z.; Nguyen, L.; Wang, D. *J. Clin. Pharmacol.* **2019**, 59 (9), 1195-1203.
15. Boussios, S.; Abson, C.; Moschetta, M.; Rassy, E.; Karathanasi, A.; Bhat, T.; Ghumman, F.; Sheriff, M.; Pavlidis, N. *Drugs R D.* **2020**, 20 (2), 55-73.
16. de Bono, J. S.; Mehra, N.; Scagliotti, G. V.; Castro, E.; Dorff, T.; Stirling, A.; Stenzl, A.; Fleming, M. T.; Higano, C. S.; Saad, F.; Buttiglieri, C.; van Oort, I. M.; Laird, A. D.; Mata, M.; Chen, H. C.; Healy, C. G.; Czibere, A.; Fizazi, K. *Lancet Oncol.* **2021**, 22 (9), 1250-1264.
17. Lesueur, P.; Chevalier, F.; El-Habr, E. A.; Junier, M. P.; Chneiweiss, H.; Castera, L.; Müller, E.; Stefan, D.; Saintigny, Y. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1), 3664.
18. Baldwin, P.; Ohman, A. W.; Medina, J. E.; McCarthy, E. T.; Dinulescu, D. M.; Sridhar, S. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 353.
19. Mateos-Pujante, A.; Jiménez, M. C.; Andreu, I. *Sci. Rep.* **2022**, 12 (1), 3434.
20. Srivastav, A. K.; Mujtaba, S. F.; Dwivedi, A.; Amar, S. K.; Goyal, S.; Verma, A.; Kushwaha, H. N.; Chaturvedi, R. K.; Ray, R. S. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2016**, 156, 87-99.
21. Garcia-Lainez, G.; Martínez-Reig, A. M.; Limones-Herrero, D.; Consuelo Jiménez, M.; Miranda, M. A.; Andreu, I. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, 341, 51-55.
22. Melhuish, W. H. *J. Phys. Chem.* **1961**, 65 (2), 229-235.
23. Marco Montalti, A. C., Luca Prodi, M. Teresa Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*. 3rd edition ed.; CRC Press: Boca Raton, 2006.
24. Hackbarth, S.; Schlothauer, J.; Preuß, A.; Röder, B. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2010**, 98 (3), 173-179.
25. Davies, M. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 305 (3), 761-770.

26. Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.; Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A. H.; Vignoni, M.; Yoshimura, T. M. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (4), 912-919.
27. Gutiérrez, I.; Bertolotti, S. G.; Biasutti, M. A.; Soltermann, A. T.; García, N. A. *Can. J. Chem.* **1997**, *75* (4), 423-428.
28. OECD, Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2019**.
29. Collins, A. R. *Methods Mol. Biol.* **2002**, *203*, 163-177.
30. Møller, P. *Mutat. Res.* **2006**, *612* (2), 84-104.
31. Strober, W. *Current protocols in immunology* **2015**, *111*, A3.B.1-a3.B.3.
32. Azqueta, A.; Collins, A. R. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (6), 949-968.
33. Gleis, M.; Schneider, T.; Schlörmann, W. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90* (10), 2315-2336.



# CAPÍTULO 6

---

Niraparib



## 6.1. Introducción.

El cáncer de ovario epitelial (*epitelial ovarian cancer*, EOC) es la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer en mujeres. Se estima que alrededor del 70 % de los casos de EOC avanzados en remisión eventualmente recaerán con independencia de la respuesta previa al tratamiento, siendo necesario desarrollar tratamientos dirigidos más personalizados<sup>1, 2</sup>. En este contexto, los inhibidores de la enzima poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARPis) han surgido como potentes fármacos antineoplásicos debido a su capacidad para inhibir la actividad PARP<sup>3</sup>. Las PARP son una familia de enzimas multifuncionales que desempeñan un papel esencial en la reparación del ADN, ya que catalizan la reparación de las roturas de cadena simple (SSB) que se producen con frecuencia en las células, lo que es crucial para su supervivencia. Sin embargo, una reparación ineficiente de SSB puede dar lugar a roturas de cadena doble (DSB), que son aún más dañinas para las células y deben repararse mediante otros mecanismos más complejos, como la recombinación homóloga (RH)<sup>4-6</sup>.

La inhibición de la enzima PARP impide la reparación de las SSB y crea complejos de PARP-ADN que evolucionan a DSB. En este punto, las células con mutaciones *BRCA1/2* germinales o somáticas no pueden reparar este tipo de daño en el ADN por RH, por lo que su acumulación sistemática conduce finalmente a la muerte celular por apoptosis<sup>7</sup>. En este contexto, se estudió el efecto del niraparib (NRP) como un potente inhibidor altamente selectivo de PARP-1 y PARP-2 en el tratamiento del cáncer de ovario epitelial recurrente con mutaciones en los genes *BRCA1/2*<sup>7, 8</sup>.

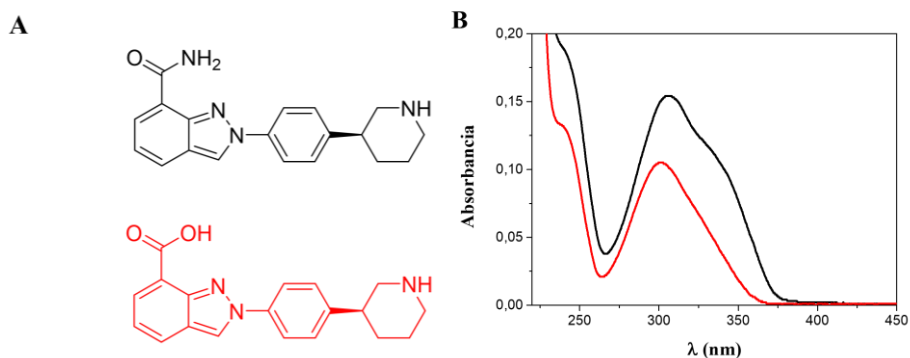
Teniendo en cuenta los buenos resultados a nivel clínico, el fármaco NRP fue aprobado por la FDA en 2017 como tratamiento de mantenimiento en monoterapia de pacientes adultas con cáncer de ovario epitelial avanzado, de trompas de Falopio o peritoneal primario que están en respuesta completa o parcial a la quimioterapia basada en cis-platino<sup>9-11</sup>, aunque actualmente hay estudios en desarrollo que

investigan su uso en el tratamiento de otros tumores sólidos, incluidos en cáncer de mama y de próstata<sup>12</sup>.

Farmacológicamente, tras la administración de una dosis de NRP de entre 200-300 mg una vez al día, este es absorbido rápidamente, alcanzando su concentración plasmática máxima en 3 horas, cuya biodisponibilidad es, aproximadamente, del 73 %; el 83 % del fármaco se une a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina sérica humana. En este contexto, NRP se metaboliza principalmente en el hígado por acción de las carboxilesterasas (CEs) para formar un metabolito inactivo principal (un ácido carboxílico)<sup>9, 10, 13</sup>, que posteriormente sufre glucuronación a través del metabolismo de fase II<sup>14</sup>. Finalmente, NRP se excreta a través de la orina (metabolitos) y las heces (fármaco inalterado) alcanzando un tiempo de semivida ( $t_{1/2}$ ) de entre 48 a 51 horas<sup>9</sup>.

A pesar de sus efectos terapéuticos, este fármaco presenta diversos efectos secundarios, tales como fatiga, náuseas, vómitos, diarrea, anorexia, dolor de cabeza, alopecia, trastornos de la piel, anemia, neutropenia y trombocitopenia. De entre sus efectos secundarios menos frecuentes, pero potencialmente graves, se incluyen síndromes mielodisplásicos, mielosupresión marcada y toxicidad embriofetal<sup>2, 10, 15</sup>. En relación con estos efectos adversos, dado que el rucaparib y el talazoparib, otros inhibidores de la PARP, son compuestos potencialmente fototóxicos, y que tanto el NRP como su metabolito N-M1 muestran una banda de absorción en la región UVA (Figura 53B), es interesante investigar su fotocomportamiento y sus propiedades fotobiológicas a través de estudios *in vitro* en células de piel humanas (queratinocitos HaCaT) para recomendar pautas de fotoprotección a los pacientes si fuese necesario, minimizando así el riesgo fotobiológico asociado a este fármaco.





**Figura 53. A:** Estructuras químicas del niraparib (NRP, negro) y su metabolito M1 (N-M1, rojo). **B:** Espectros de absorción de NRP (traza negra) y N-M1 (traza roja) 10 μM en PBS.

## 6.2. Sección experimental.

Las condiciones de cultivo celular y las medidas espectrofotométricas se realizaron de acuerdo a lo expuesto en el capítulo 3.

### 6.2.1. Fotólisis en estado estacionario.

La irradiación del NRP y N-M1 se llevó a cabo en el fotorreactor descrito anteriormente ( $\lambda_{exc} = 350$  nm) en disoluciones equimolares ( $\sim 0,1$  de absorbancia a  $\lambda = 330$  nm) en PBS en ausencia y presencia de ASH durante 60 min. El proceso se monitorizó mediante espectroscopía de absorción y de emisión de fluorescencia a  $\lambda_{exc} = 330$  nm.

### 6.2.2. Ensayo de fototoxicidad *in vitro*: captación de rojo neutro (NRU).

El ensayo de captación de rojo neutro se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con ocho concentraciones crecientes de NRP y N-M1 que oscilaban entre 0,25 - 500 μM y con los controles positivo (CPZ) y negativo (SDS).

### **6.2.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT.**

El ensayo de viabilidad celular MTT se realizó conforme se describe en el capítulo 3, donde los queratinocitos humanos (HaCaT), las células humanas de cáncer de ovario (A2780) y la variante cisplatino resistente de las células humanas de cáncer de ovario (A2780cis), fueron tratadas con ocho concentraciones crecientes de NRP y N-M1 que oscilaban entre 0,1 - 250  $\mu\text{M}$  y 0,25 - 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente, y con los controles positivo (CPZ) y negativo (SDS).

### **6.2.4. Fotooxidación de proteínas.**

La detección de la formación de proteínas carboniladas fotoinducidas se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo 3, donde las disoluciones de ASH se incubaron con cantidades crecientes de NRP (1, 2 o 5  $\mu\text{M}$ ) o de N-M1 (50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ) y se irradiaron con cantidades crecientes de dosis de irradiación UVA (5, 10, 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

### **6.2.5. Daño fotosensibilizado al ADN plasmídico.**

El ensayo de fotosensibilización al plásmido de ADN circular superenrollado pBR322 se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el capítulo 3, donde las muestras de ADN se irradiaron con una dosis de luz UVA de 15  $\text{J}/\text{cm}^2$  en presencia o ausencia de NRP (10 o 20  $\mu\text{M}$ ) o N-M1 (100 o 500  $\mu\text{M}$ ).

### **6.2.6. Ensayo cometa alcalino.**

El ensayo cometa se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células fueron tratadas con cantidades crecientes de NRP (0, 1, 2, 5 o 10  $\mu\text{M}$ ), N-M1 (0, 100, 150 o 200  $\mu\text{M}$ ) o con el control positivo (CPZ, 5  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis de irradiación de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

### 6.2.7. Fotoperoxidación lipídica.

La detección de la fotoperoxidación lipídica celular se realizó conforme al protocolo descrito en el capítulo 3, donde las células HaCaT fueron tratadas con NRP (0, 1, 5 o 10  $\mu\text{M}$ ) o con N-M1 (0, 75, 250 o 500  $\mu\text{M}$ ) e irradiadas con una dosis UVA de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ .

## 6.3 Resultados y discusión.

### 6.3.1. Estudios fotofísicos.

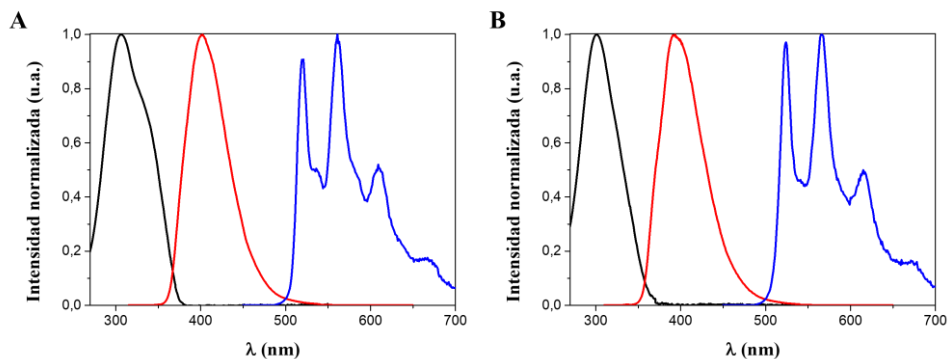
*Absorción, fluorescencia y fosforescencia.*

Los espectros de absorción UV/Vis del niraparib y su metabolito principal (Figura 53B) mostraron que ambos compuestos son capaces de absorber luz en la región UVA (315 – 400 nm) del espectro electromagnético, por tanto, podrían inducir reacciones de fotosensibilidad tras irradiación UVA, ya que, tras absorber luz solar, se pueden generar especies transitorias capaces de reaccionar con las células o sus biomoléculas, causando un daño fotosensibilizado.

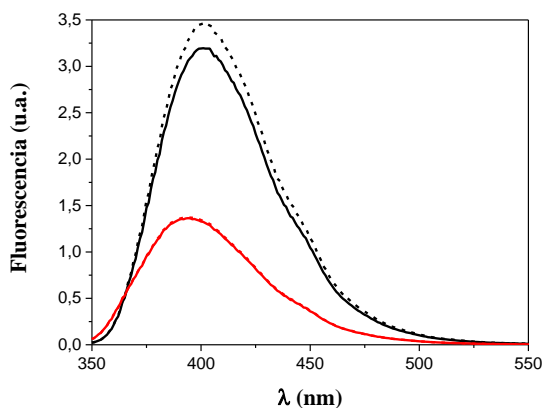
El estudio de las propiedades fotofísicas se realizó a partir de medidas por espectroscópica de absorción y de fluorescencia. Los espectros normalizados de absorción y fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 305 \text{ nm}$ ) del NRP y N-M1 en PBS se presentan en la Figura 54, donde la energía del primer estado excitado singlete ( $E_s$ ) obtenido a partir de la intersección entre ambos espectros resultó ser de 77,7 kcal/mol y 79,9 kcal/mol, respectivamente. Además, los rendimientos cuánticos de fluorescencia del NRP ( $\phi_F$ ) en disolución y en células fueron 0,87 en PBS y 0,81 en células, respectivamente, mientras que para N-M1 ambos fueron 0,38, utilizando rucaparib como estándar<sup>16</sup> (Figura 55). Por otro lado, los tiempos de vida a partir de fluorescencia fueron de 6,6 y 3,1 ns para el fármaco y el metabolito, respectivamente.

Las energías de triplete ( $E_T$ ) obtenidas a partir del 30 % de la subida de los espectros de fosforescencia realizados en matriz de etanol a 77 K (Figura 54, trazas azules)

fueron de 56,0 (NRP) y 55,7 (N-M1) kcal/mol, utilizando benzofenona como referencia<sup>17</sup>.



**Figura 54.** Espectros normalizados del NRP (A) y N-M1 (B): absorción (traza negra) en PBS a temperatura ambiente, fluorescencia ( $\lambda_{exc} = 315$  nm, traza roja) y fosforescencia ( $\lambda_{exc} = 300$  nm, traza azul) en etanol a 77 K.



**Figura 55.** Espectros de emisión de disoluciones isoabsortivas del NRP (traza negra) y su metabolito N-M1 (traza roja). Comparativa entre los espectros en disolución PBS (trazo continuo) y tras su internalización en células HaCaT (trazo discontinuo).

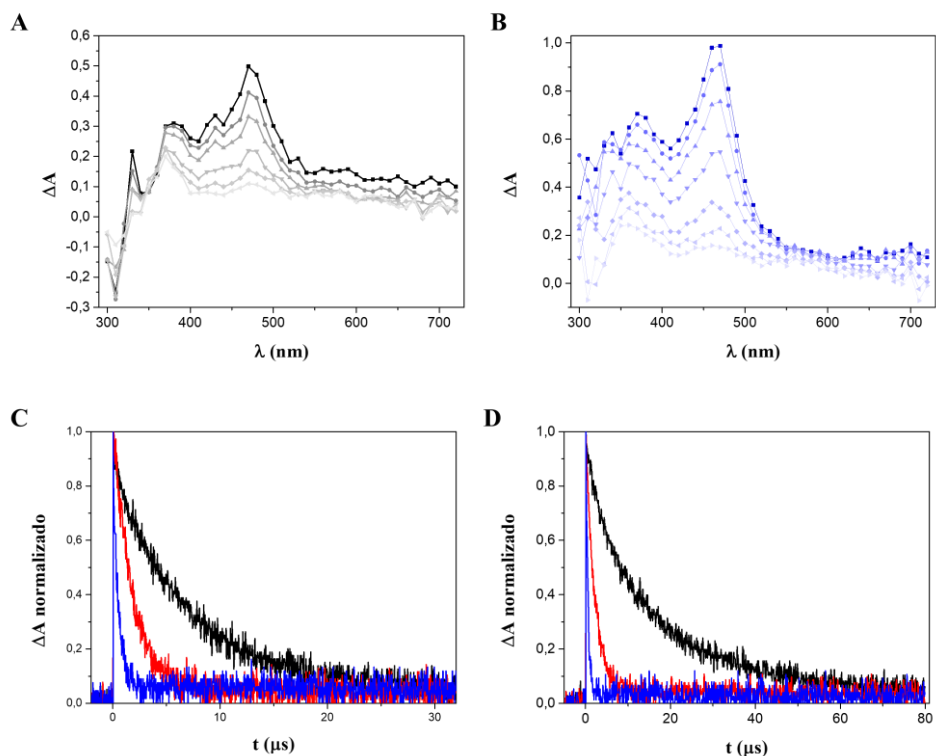
Cabe destacar que, a pesar de la gran similitud entre los valores de la energía de los estados excitados singlete, tanto el rendimiento cuántico como el tiempo de vida de fluorescencia de N-M1 disminuyeron significativamente en comparación con el

---

fármaco original, hasta prácticamente la mitad. Posteriormente, se realizaron experimentos de fotólisis de destello láser con el fin de detectar las especies transitorias de los compuestos.

*Fotólisis de destello láser.*

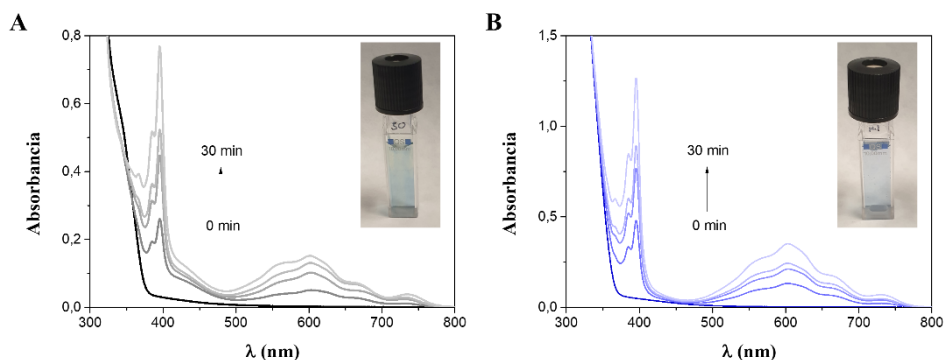
Así, para detectar especies reactivas generadas tras la excitación de NRP o N-M1, se utilizó la técnica de fotólisis de destello láser. Tras la excitación de los compuestos a  $\lambda = 355$  nm en PBS en condiciones anaeróbicas, se obtuvieron los correspondientes espectros de absorción transitoria, donde ambos compuestos presentaron una banda de absorción principal con un máximo a 470 nm (Figura 56A y Figura 56B). La cinética de esta señal fue diferente para NRP y su metabolito, ya que los datos del fármaco se ajustaron a una función de tipo monoexponencial decreciente ( $\tau = 7,5$   $\mu$ s), mientras que para N-M1 el ajuste fue de tipo biexponencial decreciente ( $\tau_1 = 19,3$   $\mu$ s;  $\tau_2 = 4,3$   $\mu$ s), (Figura 56C y Figura 56D). Para ambos compuestos, las señales se desactivaron en presencia de oxígeno, con una constante de desactivación controlada por la difusión, del orden de  $10^9$   $M^{-1}s^{-1}$ .



**Figura 56.** Fotólisis de destello láser de NRP 50  $\mu\text{M}$  y de N-M1 250  $\mu\text{M}$  en PBS a  $\lambda = 355$  nm. Espectros de absorción transitoria en atmósfera inerte a diferentes ventanas de tiempo, desde 0,5 hasta 15  $\mu\text{s}$  para el NRP (A) y desde 1 hasta 32  $\mu\text{s}$  para el N-M1 (B). Cinéticas de desactivación normalizadas monitorizadas a  $\lambda = 470$  nm en nitrógeno (traza negra), aire (traza roja) y oxígeno (traza azul) de NRP (C) y N-M1 (D).

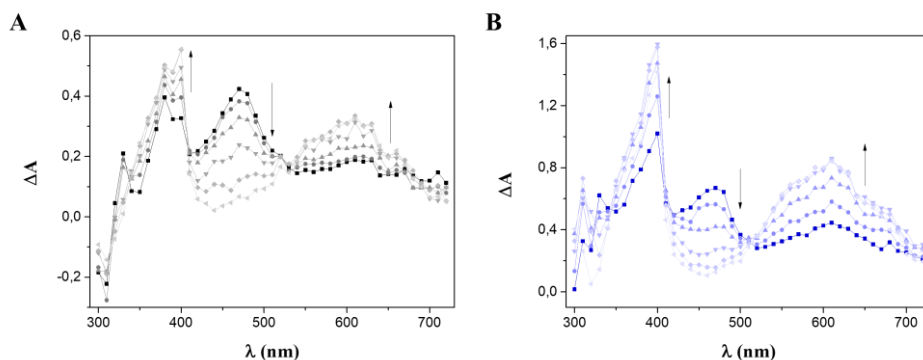
Para investigar la participación de especies de tipo aniónico o catiónico, se realizó un experimento en presencia de metil viológeno ( $\text{MV}^{2+}$ ) como desactivador, un compuesto ampliamente conocido por su capacidad para reducirse por captación de electrones en atmósfera inerte, dando lugar a un catión radical con un tiempo de vida muy elevado y un espectro característico con dos bandas principales centradas a 395 y 600 nm<sup>18, 19</sup>, que además le otorgan un color azulado apreciable a simple vista<sup>20</sup>.

Dado que el tiempo de vida del catión radical del  $MV^{2+}$  es muy elevado, su formación se monitorizó inicialmente por espectroscopía de absorción estacionaria, irradiando disoluciones isoabsortivas de  $A = 0,30$  a  $\lambda = 355$  nm (NRP  $50 \mu\text{M}$  y N-M1  $250 \mu\text{M}$ ) en PBS con  $MV^{2+}$   $30$  mM en un fotorreactor en las condiciones descritas anteriormente. El proceso se monitorizó siguiendo los cambios en los espectros de absorción (Figura 57) a tiempos de irradiación crecientes.

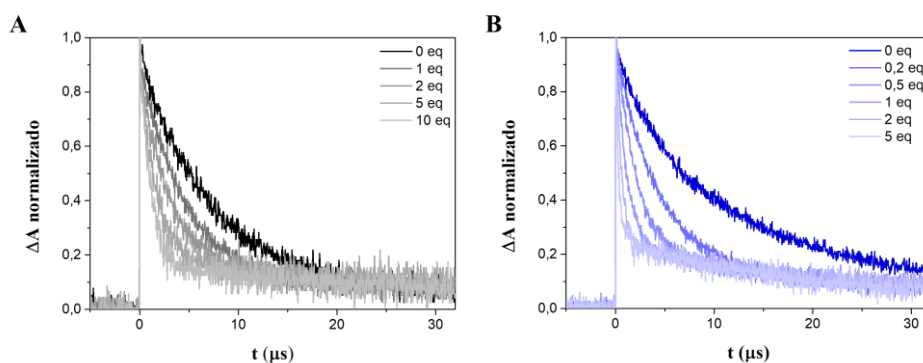


**Figura 57.** Cambios en los espectros de absorción de NRP  $50 \mu\text{M}$  (A) y N-M1  $250 \mu\text{M}$  (B) en presencia de  $MV^{2+}$   $30$  mM en PBS tras su irradiación a  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, desde 0 hasta 30 min. Figura insertada: disoluciones de NRP (A) y N-M1 (B) con  $MV^{2+}$  tras 30 min de irradiación (inicialmente eran incoloras).

En ambos casos, se observó la aparición de dos nuevas bandas centradas a  $395$  y  $600$  nm, que, tal y como se ha comentado anteriormente, corresponden a la formación del radical catión del  $MV^{2+}$ , el cual fue apreciable a simple vista como un cambio de color de la disolución de incoloro a azul (Figura 57, figura insertada). Estos resultados sugieren que, tras irradiar con luz UVA en medio acuoso tamponado, se ha generado para NRP y N-M1 una especie transitoria aniónica capaz de reaccionar con el  $MV^{2+}$ ; por ello, el siguiente paso consistió en caracterizar esta especie transitoria aniónica en ambos compuestos, monitorizando su desactivación a  $\lambda = 470$  nm en presencia de cantidades crecientes de  $MV^{2+}$  ( $0,2$ ,  $0,5$ ,  $1$ ,  $2$ ,  $5$  y  $10$  eq.) mediante fotólisis de destello láser a  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm.



**Figura 58.** Fotólisis de destello láser de NRP 50  $\mu\text{M}$  (A) y de N-M1 250  $\mu\text{M}$  (B) en PBS en presencia de  $\text{MV}^{2+}$  (1 eq.) a  $\lambda = 355$  nm. Espectros de absorción transitoria a diferentes ventanas de tiempo (desde 0,5 hasta 16  $\mu\text{s}$  para el NRP y desde 0,25 hasta 8  $\mu\text{s}$  para el N-M1) en atmósfera inerte.



**Figura 59.** Cinéticas de desactivación normalizadas de NRP 50  $\mu\text{M}$  (A) y N-M1 250  $\mu\text{M}$  (B) en PBS a  $\lambda = 355$  nm con cantidades crecientes de  $\text{MV}^{2+}$  monitorizadas a  $\lambda = 470$  nm.

Los espectros transitorios obtenidos (Figura 58) evidenciaron, por un lado, la formación del catión radical del  $\text{MV}^{2+}$  (bandas centradas a 395 y 600 nm) y, por otro lado, la desactivación de la señal (tanto de NRP como de N-M1) simultáneamente a la formación del catión radical del  $\text{MV}^{2+}$ . La desactivación de la señal a 470 nm con cantidades crecientes de  $\text{MV}^{2+}$  (Figura 59) corrobora la presencia de la especie transitoria aniónica mencionada anteriormente, tanto para NRP como para su metabolito N-M1, siendo esta desactivación más rápida para el metabolito.



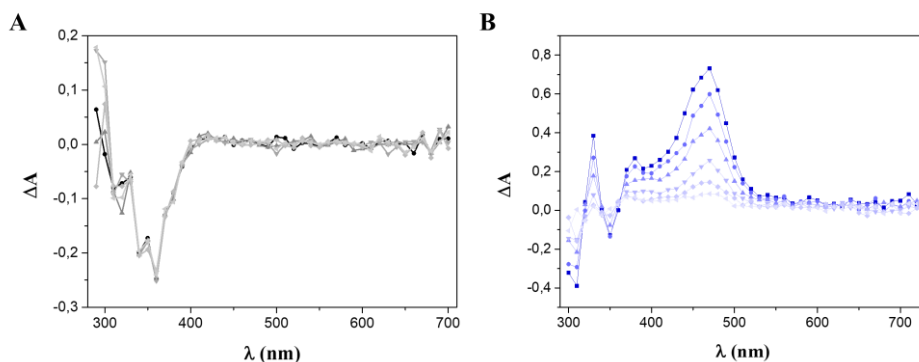
Seguidamente, se ajustaron las cinéticas de desactivación por adición de  $MV^{2+}$  y las constantes de desactivación de este proceso se obtuvieron mediante la ecuación de Stern-Volmer. Una vez más, para NRP los datos se ajustaron a una función monoexponencial, mientras que para N-M1 el ajuste fue biexponencial, obteniéndose valores de  $7,9 \cdot 10^{10}$  (NRP) y  $1,1 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (N-M1, tiempo más largo obtenido en el ajuste biexponencial), indicando que el proceso de desactivación está gobernado por difusión.

**Tabla 10.** Ajuste mono y biexponencial de las cinéticas de desactivación de NRP y N-M1 en presencia de  $MV^{2+}$ .

NRP		N-M1	
Eq. $MV^{2+}$	$\tau_1$	Eq. $MV^{2+}$	$\tau_1 / \tau_2$
0 eq.	7,5	0 eq.	19,3 / 5,2
0,2 eq.	6,6	0,2 eq.	8,8 / 5,1
0,5 eq.	5,85	0,5 eq.	1,56 / 4,8
1 eq.	4,64	1 eq.	0,91 / 4,5
2 eq.	3,31	2 eq.	0,57 / 4,1
5 eq.	1,75	5 eq.	0,21 / 3,87
10 eq.	1,1	10 eq.	0,09 / 3,45

Eq = equivalentes de  $MV^{2+}$  con respecto a la concentración de NRP y N-M1, según corresponda.

A la vista de los resultados obtenidos recopilados en la Tabla 10, la señal centrada a 470 nm en el espectro de absorción transitoria de NRP se asignó a una especie con carga negativa, que podría formarse a través de una transferencia de protón intramolecular, que daría a la formación de un zwitterión. En el caso de N-M1, el tiempo más largo también se atribuyó a una especie de carácter aniónico, mientras que el tiempo más corto correspondería al triplete, ya que no fue desactivado por  $MV^{2+}$  y sí por oxígeno. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se registraron los espectros de absorción transitoria en acetonitrilo, un disolvente polar aprótico que no favorece la transferencia de carga (Figura 60).



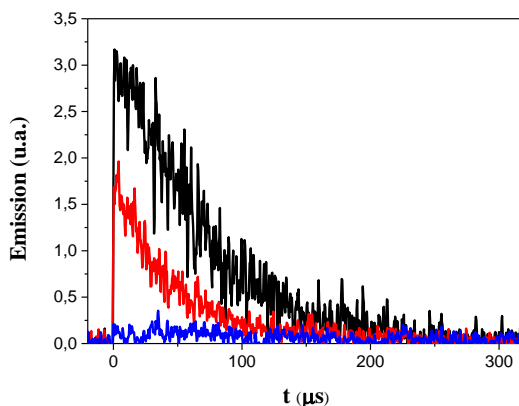
**Figura 60.** Fotólisis de destello láser de NRP y N-M1 en MeCN. Espectros de absorción transitoria a diferentes ventanas de tiempo (desde 0,5 hasta 8  $\mu$ s) para NRP (**A**) y N-M1 (**B**) en atmósfera inerte.

De modo remarcable, no se observó ninguna señal de absorción en el espectro de NRP, mientras que N-M1 exhibió una banda intensa centrada a 470 nm, con un tiempo de vida de 3,7  $\mu$ s, atribuido al estado excitado triplete. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en PBS, donde no se observaba triplete para NRP, pero sí para su metabolito. Como es de esperar, la especie de naturaleza aniónica no se observó en acetonitrilo, al tratarse de un medio que no estabiliza estas especies.

#### *Generación de oxígeno singlete.*

Por otra parte, desde un punto de vista fotobiológico, las especies excitadas triplete son intermedios clave que pueden inducir daño a las proteínas<sup>21</sup> y a otras biomoléculas, como el ADN<sup>22</sup> a través de varios mecanismos iniciados por abstracción de hidrógeno o de transferencia de carga/energía (mecanismo de tipo I), y/o transferencia de energía de un fotosensibilizador al oxígeno molecular, generando la formación de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$  o  $^1\Delta_g$ , mecanismo de tipo II)<sup>23</sup>. A continuación, se investigó la generación de oxígeno singlete mediante medidas de luminiscencia de tiempo resuelto a 1270 nm en acetonitrilo tras la excitación del NRP y N-M1 con el láser a 355 nm, utilizando tetrametil-*p*-benzoquinona (DQ,  $\phi_\Delta = 0,89$ ;  $\tau_\Delta \sim 65 \mu$ s) en acetonitrilo como referencia<sup>17</sup>. Como resultado, solamente se

detectó la generación de  $^1\text{O}_2$  en el metabolito ( $\phi_\Delta = 0,44$ ;  $\tau_\Delta = 46,9 \mu\text{s}$ ), tal y como se puede apreciar en la Figura 61, en las condiciones experimentales descritas anteriormente (véase capítulo 3).



**Figura 61.** Experimentos de tiempo resuelto a 1270 nm tras excitación a 355 nm de disoluciones aireadas de NRP (traza azul) o N-M1 (traza roja) en MeCN para la detección de  $^1\text{O}_2$ . Se utilizó tetrametil-p-benzoquinona (DQ, traza negra) como referencia.

Finalmente, las principales propiedades fotofísicas del NRP y N-M1 se recopilan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Principales propiedades fotofísicas del niraparib y su metabolito.

	NRP	N-M1
$\lambda_{\text{max}}$ absorción (nm) <sup>a, b</sup>	305	300
$\lambda_{\text{max}}$ emisión (nm) <sup>a, c</sup>	402	393
$E_s$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	77,7	79,9
$\phi_F^a$	0,87	0,38
$\tau_F$ (ns) <sup>a</sup>	6,6	3,1
$\lambda_{\text{max}}$ fosforescencia (nm) <sup>d, e</sup>	520, 562, 610	524, 566, 615
$E_T$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>	56	55,7
$\lambda_{\text{max}}$ absorción transitoria (nm) <sup>f, g</sup>	470	470
$\tau_{\text{especie aniónica}}$ ( $\mu\text{s}$ ) <sup>f, g</sup>	7,5	19,3
$\tau_T$ ( $\mu\text{s}$ ) <sup>f, g</sup>	-	5,2
$k_q$ (O <sub>2</sub> ) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>f, g</sup>	$1,4 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
$\phi_{\Delta}^h$	-	0,44
$\tau_{\Delta}$ ( $\mu\text{s}$ ) <sup>h</sup>	-	46,9

<sup>a</sup> 10  $\mu\text{M}$ , PBS,  $T_{\text{amb}}$ , aire; <sup>b</sup> espectroscopía de absorción; <sup>c</sup> espectroscopía de fluorescencia; <sup>d</sup> 30  $\mu\text{M}$  (NRP), 35  $\mu\text{M}$  (N-M1), etanol, 77K, air; <sup>e</sup> espectroscopía de fosforescencia; <sup>f</sup> espectroscopía de absorción transitoria; <sup>g</sup> 50  $\mu\text{M}$  (NRP), 250  $\mu\text{M}$  (N-M1), PBS,  $T_{\text{amb}}$ , N<sub>2</sub>; <sup>h</sup> detectado por luminiscencia a 1270 nm, 150  $\mu\text{M}$  (NRP), 275  $\mu\text{M}$  (N-M1), MeCN,  $T_{\text{amb}}$ , aire.

### 6.3.2. Estudios de fototoxicidad celular *in vitro*.

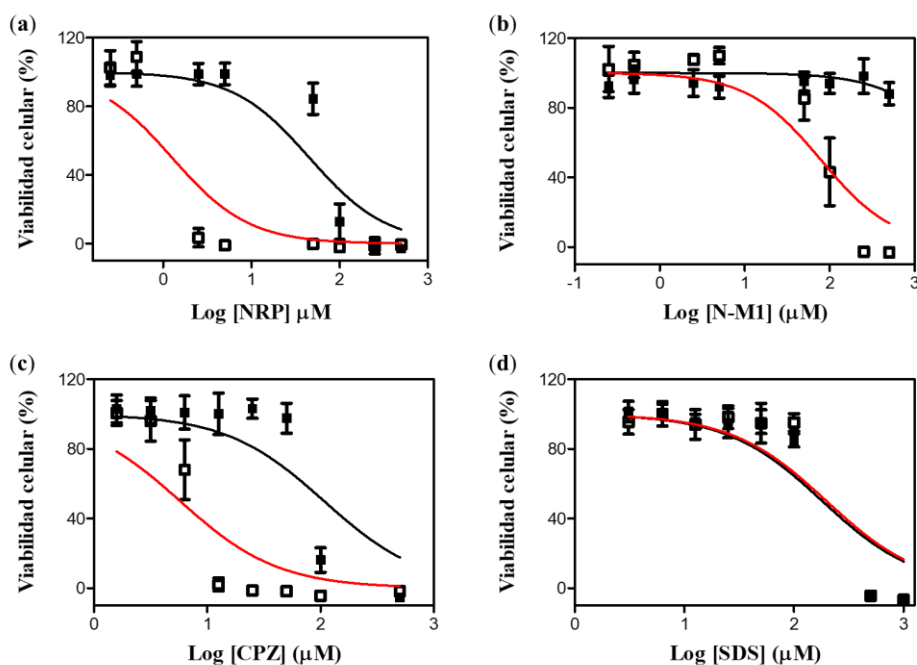
#### *Ensayo de captación de rojo neutro.*

Con el fin de evaluar el potencial fototóxico de NRP y N-M1 en combinación la con radiación ultravioleta, se realizó una prueba de fototoxicidad *in vitro* con queratinocitos humanos inmortalizados. Para ello, se trataron células HaCaT con concentraciones crecientes de cada compuesto, utilizando el colorante rojo neutro como indicador de viabilidad celular y la clorpromazina (CPZ) y el dodecilsulfato sódico (SDS) como controles positivo y negativo, respectivamente, tanto en condiciones de oscuridad o tras irradiar con luz UVA ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ , dosis de irradiación = 5 J/cm<sup>2</sup>). De esta forma, los valores de IC<sub>50</sub> se recogen en la (Tabla 12), los cuales fueron determinados a partir de las curvas de dosis-respuesta (Figura 62). Finalmente, se calculó el valor del factor de fotoirritación (PIF), que corresponde a la relación entre los valores de IC<sub>50</sub> en oscuridad y luz.

**Tabla 12.** Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) y PIF obtenidos a partir del ensayo de fototoxicidad HaCaT NRU *in vitro* de NRP y N-M1 realizado a  $\lambda_{exc} = 350$  nm.

Compuesto	$IC_{50}$ (oscuridad)	$IC_{50}$ luz UVA	PIF <sup>1</sup>
CPZ	108 $\pm$ 40	6 $\pm$ 2	16
SDS	181 $\pm$ 54	198 $\pm$ 69	1
NRP	46 $\pm$ 15	1 $\pm$ 0,5	46
N-M1	> 500	76 $\pm$ 26	6*

Los datos corresponden con la media  $\pm$  s de cuatro experimentos realizados en triplicado. <sup>1</sup>De acuerdo con las directrices de la OECD 432 (2019),  $PIF < 2$  indica "no fototoxicidad",  $2 < PIF < 5$  indica "fototoxicidad probable" y  $PIF > 5$  indica "fototoxicidad". \*El valor PIF se estimó tomando como valor de  $IC_{50}$  en oscuridad la concentración más alta testada (500  $\mu M$ ).



**Figura 62.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células HaCaT tratadas con niraparib (NRP, **a**), su metabolito M1 (N-M1, **b**), clorpromazina (CPZ, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia ( $\square$ ) o ausencia ( $\blacksquare$ ) de luz UVA (5  $J/cm^2$ ), donde CPZ y SDS se utilizaron como controles positivo y negativo de fototoxicidad, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

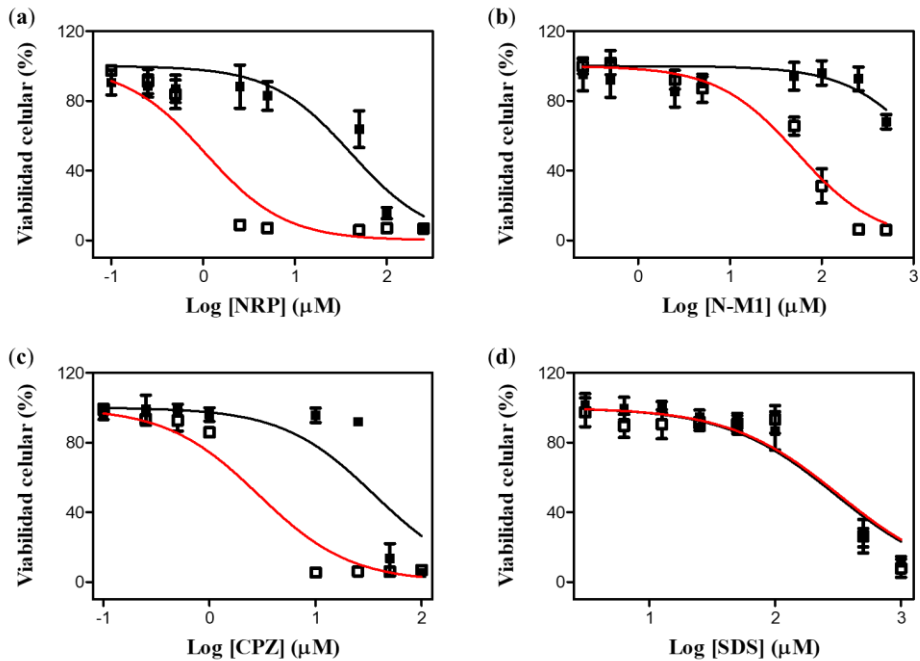
Los resultados presentados en la Tabla 12 mostraron que el valor PIF del NRP fue de 46, con un  $IC_{50}$  en oscuridad de  $46 \pm 15 \mu\text{M}$  y un  $IC_{50}$  en luz UVA de  $1 \pm 0,5 \mu\text{M}$ , mientras que para el metabolito, su valor PIF se estimó en 6, con un  $IC_{50}$  en oscuridad de  $> 500 \mu\text{M}$  (se fijó la concentración más alta ensayada dado que no fue posible obtener un valor de  $IC_{50}$  en las condiciones del experimento) y un  $IC_{50}$  en luz UVA de  $76 \pm 26 \mu\text{M}$  que, de acuerdo con las directrices de la OECD 432 (2019)<sup>24</sup>, ambos compuestos son fototóxicos, presentando un mayor potencial el fármaco original.

Teniendo en cuenta que hay que llegar a un compromiso entre la eficiencia de un fármaco y sus efectos adversos, incluida la fototoxicidad, se decidió evaluar la viabilidad celular del NRP, puesto que su  $IC_{50}$  obtenida en oscuridad fue baja, indicando su elevado potencial citotóxico como era esperado. Para este fin, se llevó a cabo un ensayo MTT en células de cáncer de ovario (2780) y su variante cisplatino resistente (A2780cis). Esto podría revelar si este fármaco con capacidades fotosensibilizantes podría utilizarse en las terapias fotodinámicas (PDT), ya que éstas recientemente están adquiriendo relevancia en la aplicación a órganos internos (como el ovario, entre otros)<sup>25</sup> gracias al desarrollo de fibras ópticas, lo que permite ofrecer un tratamiento mínimamente invasivo que aproveche el oxígeno intracelular de las células a tratar para generar ROS tras la interacción del fármaco administrado previamente con una fuente de luz visible enfocada en un lugar concreto.

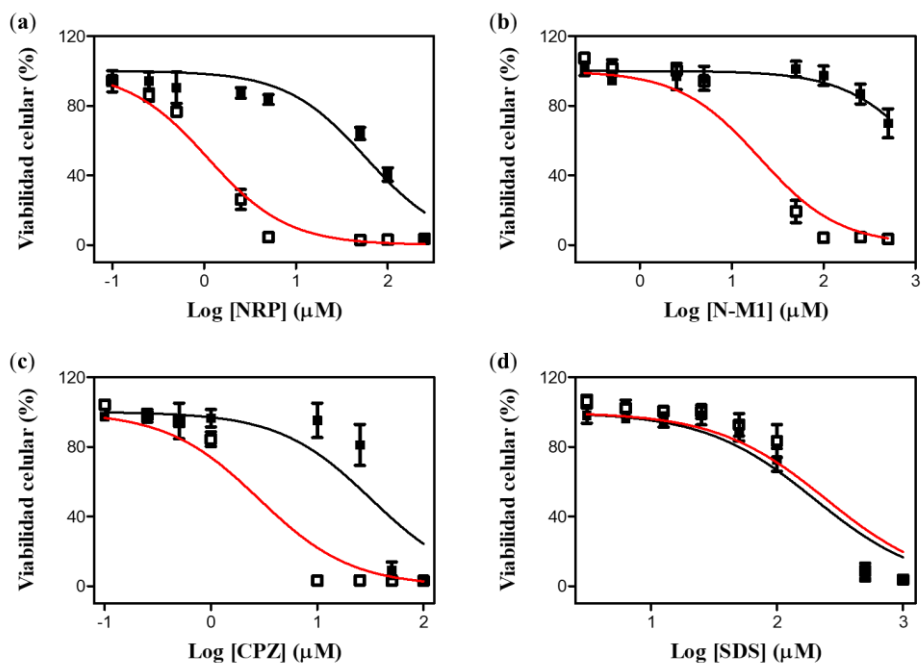
### *Viabilidad celular por MTT.*

Ha sido descrito que el NRP ha sido descrito que internaliza en las células cancerosas de ovario, como las células A2780<sup>26</sup>. Por ello, se realizó un ensayo de viabilidad celular en células cancerosas de ovario (A2780), su variante cis-resistente (A2780cis), y queratinocitos humanos (HaCaT) con cantidades crecientes de cada compuesto en condiciones de oscuridad o luz UVA ( $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ , dosis de irradiación =  $5 \text{ J/cm}^2$ ), utilizando el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difeníl tetrazolio o MTT como indicador de viabilidad celular, un compuesto que es reducido por la

actividad mitocondrial de las células a su forma insoluble formazán, el cual posee un color púrpura que se puede monitorizar por absorbancia a 540 nm. De esta forma, a partir de las curvas dosis-respuesta (Figura 63, Figura 64 y Figura 65) se determinaron los valores de  $IC_{50}$  en oscuridad o luz UVA (Tabla 13).

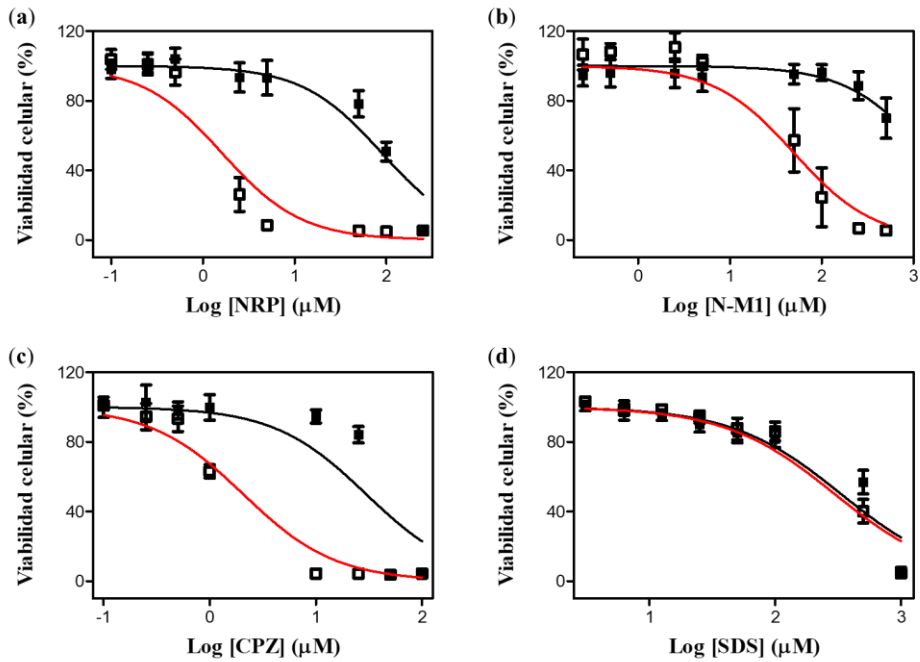


**Figura 63.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células **HaCaT** tratadas con niraparib (NRP, **a**), su metabolito M1 (N-M1, **b**), clorpromazina (CPZ, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia (□) o ausencia (■) de luz UVA ( $5 \text{ J/cm}^2$ ), donde CPZ y SDS se utilizaron como controles de citotoxicidad en presencia o ausencia de irradiación, respectivamente. Los datos representan la media  $\pm$  s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.



**Figura 64.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células **A2780** tratadas con niraparib (NRP, **a**), su metabolito M1 (N-M1, **b**), clorpromazina (CPZ, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia (□) o ausencia (■) de luz UVA (5 J/cm<sup>2</sup>), donde CPZ y SDS se utilizaron como controles de citotoxicidad en presencia o ausencia de irradiación, respectivamente. Los datos representan la media ± s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.





**Figura 65.** Curvas de dosis-respuesta de viabilidad celular de células **A2780cis** tratadas con niraparib (NRP, **a**), su metabolito M1 (N-M1, **b**), clorpromazina (CPZ, **c**) y dodecilsulfato sódico (SDS, **d**) en presencia (□) o ausencia (■) de luz UVA (5 J/cm<sup>2</sup>), donde CPZ y SDS se utilizaron como controles de citotoxicidad en presencia o ausencia de irradiación, respectivamente. Los datos representan la media ± s de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

**Tabla 13.** Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos a partir del ensayo de viabilidad celular MTT.

Línea celular	IC <sub>50</sub> CPZ (μM)	IC <sub>50</sub> SDS (μM)	IC <sub>50</sub> NRP (μM)	IC <sub>50</sub> N-M1 (μM)
HaCaT	36 ± 10 <sup>a</sup>	303 ± 58 <sup>a</sup>	41 ± 14 <sup>a</sup>	> 500 <sup>a, *</sup>
	3 ± 0,1 <sup>b</sup>	321 ± 19 <sup>b</sup>	1 ± 0,1 <sup>b</sup>	54 ± 1,3 <sup>b</sup>
A2780	32 ± 11 <sup>a</sup>	198 ± 34 <sup>a</sup>	58 ± 6 <sup>a</sup>	> 500 <sup>a, *</sup>
	3 ± 0,2 <sup>b</sup>	245 ± 20 <sup>b</sup>	1 ± 0,01 <sup>b</sup>	20 ± 1,2 <sup>b</sup>
A2780cis	30 ± 6 <sup>a</sup>	334 ± 87 <sup>a</sup>	89 ± 12 <sup>a</sup>	> 500 <sup>a, *</sup>
	2 ± 0,4 <sup>b</sup>	298 ± 10 <sup>b</sup>	2 ± 0,1 <sup>b</sup>	50 ± 2,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>resultados obtenidos en oscuridad, <sup>b</sup>resultados obtenidos tras irradiar con una dosis UVA de 5 J/cm<sup>2</sup>.

\*El valor IC<sub>50</sub> se estimó tomando como valor la concentración más alta testada (500 μM).

Interesantemente, como se puede observar en la Tabla 13, los resultados obtenidos en el ensayo MTT fueron similares a los del ensayo NRU, confirmándose así el potencial fototóxico tanto del metabolito como del fármaco original. Además, N-M1 no presentó ningún perfil citotóxico en ninguna de las líneas celulares ensayadas, lo que guardaría relación con el efecto no farmacológico del metabolito previamente reportado. En consecuencia, el valor de IC<sub>50</sub> = 500 μM solo es una estimación y la citotoxicidad real podría ser mucho menor, provocando a su vez que tuviese un potencial fototóxico mayor.

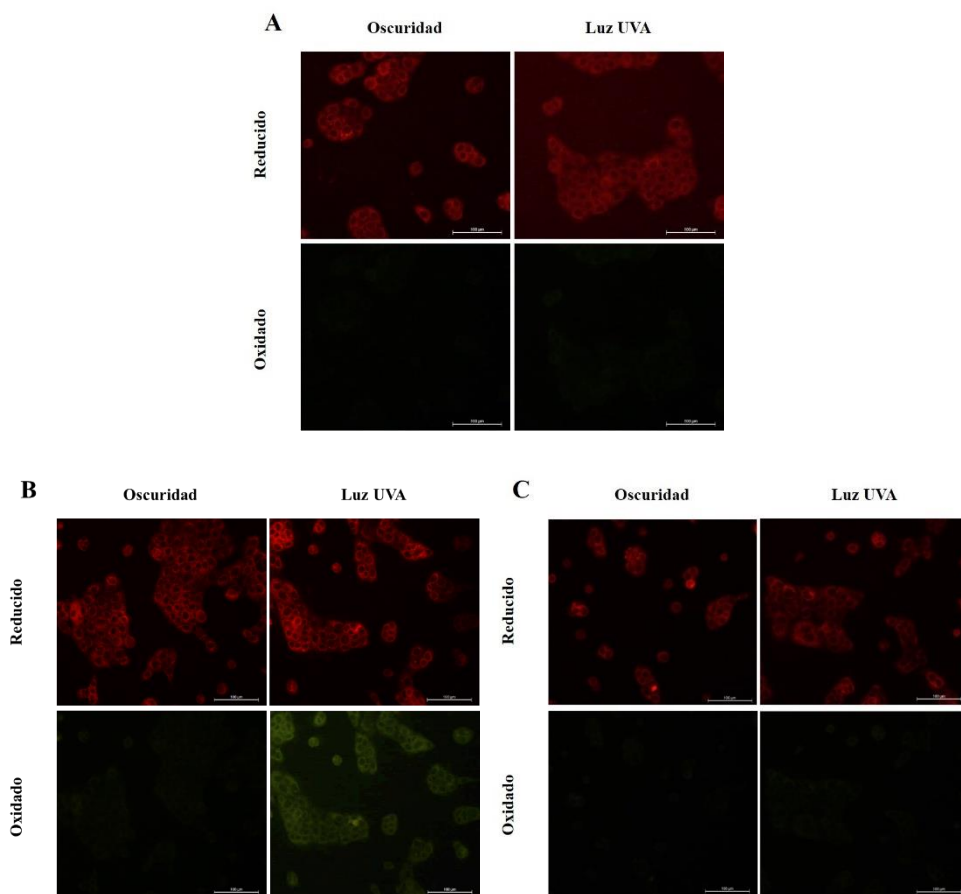
A pesar de las diferencias celulares entre las HaCaT y A2780, no se observaron diferencias significativas entre los valores de los IC<sub>50</sub> en las líneas celulares utilizadas en este experimento, por lo que podría ser interesante utilizar en un futuro este fármaco en terapias fotodinámicas, aprovechando su capacidad para inducir daño oxidativo en las células cancerosas tras su irradiación.

Como ya se ha visto que tanto NRP como N-M1 son potenciales fototóxicos, los siguientes experimentos irán enfocados a detectar el daño fotooxidativo hacia las principales dianas celulares: lípidos, proteínas y al ADN.

### 6.3.3. Fotooxidación de lípidos.

Los lípidos constituyen el principal componente de las membranas celulares, que es la estructura encargada de separar tanto el medio extracelular del intracelular como de permitir el paso de sustancias a su través. Por ello, es una estructura fundamental para el buen funcionamiento de las células, y su deterioro conlleva el desarrollo de procesos patológicos, entre ellos, la muerte celular. En este contexto, se investigó la fotoperoxidación lipídica generada por NRP o N-M1 utilizando la sonda fluorescente C11-Bodipy<sup>581/591</sup>, una sonda molecular ampliamente descrita en la bibliografía por ser un compuesto capaz de penetrar la membrana plasmática y ser extremadamente sensible a la oxidación por radicales libres generados a partir de hidroperóxidos<sup>27, 28</sup>, lo que genera la formación de productos de oxidación cuya emisión de fluorescencia se desplaza del rojo ( $\lambda_{exc} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ ) al verde ( $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$ )<sup>27, 28</sup>. Para una mayor información, véase el capítulo 3.

Para ello, se sembraron células HaCaT en placas de 24 pocillos, se trataron con NRP (0, 1, 5 o 10  $\mu\text{M}$ ) o con N-M1 (0, 75, 250 o 500  $\mu\text{M}$ ) y se irradiaron con una dosis UVA de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  o se mantuvieron en oscuridad como control del experimento. Posteriormente, las células se tiñeron con 10  $\mu\text{M}$  de C11-Bodipy<sup>581/591</sup> y finalmente se registró la fluorescencia de las formas reducida y oxidada del Bodipy mediante microscopía de fluorescencia (Figura 66).



**Figura 66.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de fotoperoxidación lipídica en queratinocitos humanos (HaCaT). Las células se incubaron en ausencia (A) o presencia de NRP 10  $\mu\text{M}$  (B) o N-M1 500  $\mu\text{M}$  (C) y mantenidas en oscuridad o irradiadas con luz UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Todas las condiciones se trataron con C11-Bodipy<sup>581/591</sup> 10  $\mu\text{M}$  y se capturaron las imágenes de fluorescencia tanto de la forma reducida (fluorescencia roja) como de la forma oxidada (fluorescencia verde). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes a escala: 100  $\mu\text{M}$ .

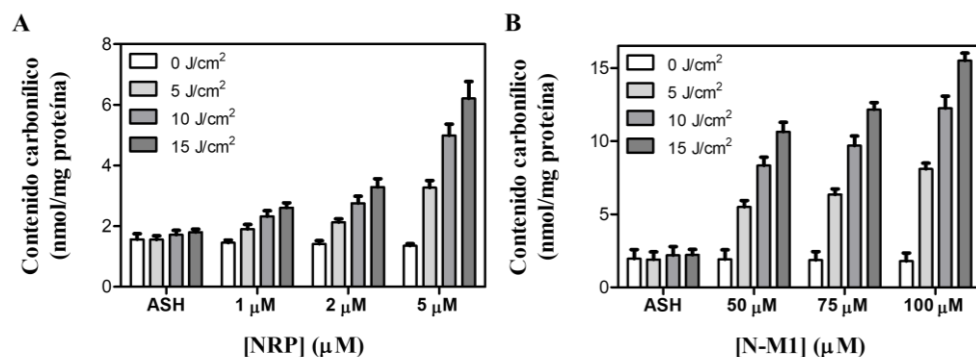
Las imágenes mostradas en la Figura 66 revelaron por un lado que no hubo fotoperoxidación lipídica en las células no tratadas (A) en ninguno de los casos (ni en oscuridad, ni tras irradiar con luz UVA), ya que no se registró ninguna señal

fluorescente de la forma oxidada (fluorescencia verde). Estos resultados son los que cabría esperar en este caso, debido al tratarse del control negativo del experimento.

Por otro lado, sí se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia verde (producto oxidado del Bodipy) en presencia del fármaco (B) en las condiciones de irradiación UVA con respecto a las no irradiadas, lo que indica un cierto grado de peroxidación lipídica. Sin embargo, este aumento de fluorescencia no se observó en presencia del metabolito (C), indicando que, en esas condiciones, no se detectó esta peroxidación. Estos resultados evidencian una diferencia entre el fármaco y su metabolito, ya que mientras el niraparib es capaz de inducir un ligero daño fotooxidativo a los lípidos de la membrana celular, su metabolito no, lo que, en consonancia con los resultados de viabilidad celular, confirma un mayor potencial fototóxico para el fármaco.

#### **6.3.4. Fotooxidación de proteínas.**

La modificación oxidativa irreversible que generalmente se produce con más frecuencia en las proteínas es la carbonilación. Además, teniendo en cuenta que el niraparib se une eficientemente a las proteínas plasmáticas y que el metabolito es capaz de generar  $^1\text{O}_2$ , se determinó mediante el ensayo de derivatización de la DNPH el contenido carbonílico de sistemas NRP/ASH y N-M1/ASH como un posible biomarcador del daño oxidativo. De esta forma, se irradiaron disoluciones de PBS que contenían ASH (0,075  $\mu\text{M}$ ) y NRP (0, 1, 2 o 5  $\mu\text{M}$ ) o N-M1 (0, 50, 75 o 100  $\mu\text{M}$ ) con diferentes dosis de luz UVA (0, 5, 10 y 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) y posteriormente se midió el contenido carbonílico de todas las condiciones.



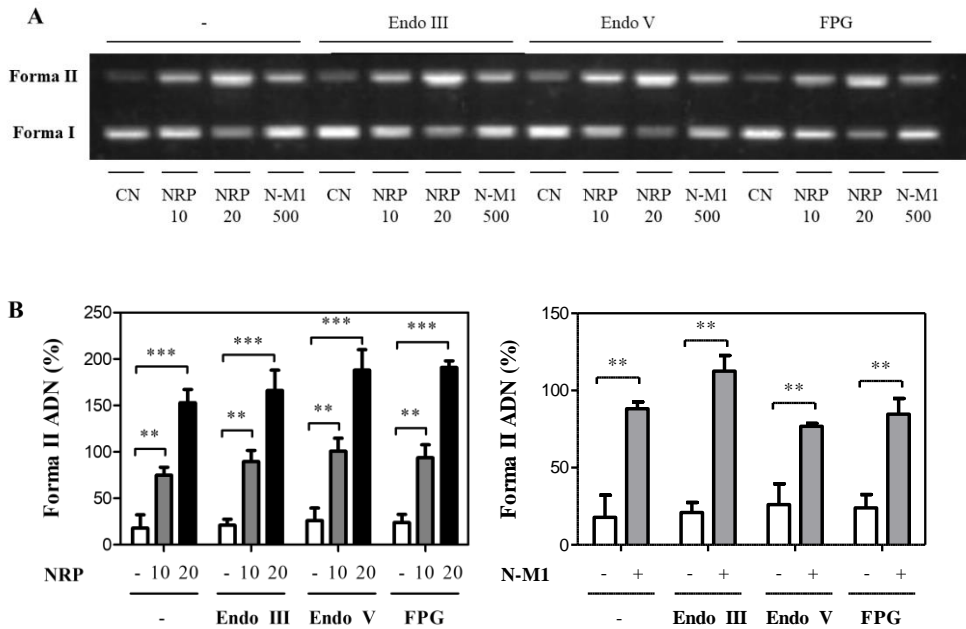
**Figura 67.** Fotooxidación de proteínas por niraparib y su metabolito M1. El contenido carbonílico fue determinado mediante el método de derivatización de la DNPH. Condiciones: ASH (0,075 μM), NRP: 1, 2 o 5 μM, N-M1: 50, 75 o 100 μM, dosis de irradiación (escala de grises): 0 (□), 5 (◐), 10 (◑) o 15 (■) J/cm<sup>2</sup>. Los datos representan la media ± s de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Los resultados mostrados revelaron que el contenido de carbonilos de los sistemas NRP/ASH (Figura 67A) y N-M1/ASH (Figura 67B) aumentó significativamente tras la irradiación UVA, hasta prácticamente triplicar (para NRP) y septuplicar (para N-M1) su valor con respecto a la muestra irradiada, lo que evidencia la capacidad del fármaco para inducir fotooxidación a las proteínas de las membranas celulares, que en relación la generación de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> observada en acetonitrilo, un disolvente que emula las condiciones lipofílicas de las proteínas, resultando ser mucho más acusada para el metabolito.

### 6.3.5. Evaluación del daño fotoinducido al ADN.

#### *Daño fotosensibilizado al ADN.*

El daño fotosensibilizado al ADN resulta de gran interés, puesto que, de no repararse correctamente, puede generar mutaciones y, en última instancia, carcinogénesis. En este contexto, con el objetivo de evaluar la fotogenotoxicidad por NRP y su metabolito, se realizaron irradiaciones a  $\lambda = 355$  nm de NRP y N-M1 en presencia de ADN circular superenrollado (pBR322) con una dosis UVA de 15 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 68.** Daño fotosensibilizado al plásmido de ADN. **A** Electroforesis de gel de agarosa del plásmido de ADN (pBR322, 250 ng/ $\mu$ L) irradiado (15 J/cm<sup>2</sup>) solo (-) o tratado con NRP (10, 20  $\mu$ M), o N-M1 (500  $\mu$ M) seguido de una digestión enzimática con enzimas de restricción Endo III, Endo V o FPG para detectar productos de degradación de bases pirimidínicas, dímeros de timina ciclobutano y purinas oxidadas, respectivamente. El gel es representativo de tres experimentos independientes. **B** Porcentajes de la forma II del ADN irradiado en presencia de NRP (izquierda) o N-M1 (derecha) cuantificado mediante densitometría utilizando el software ImageJ. Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican las diferencias significativas por el test t-Student (ns: no significativo, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

La electroforesis en gel de agarosa reveló una conversión de la forma I nativa superenrollada a la forma II mellada y relajada (Figura 68A), donde la cuantificación de la forma II por densitometría (Figura 68B) mostró la formación de roturas de cadena simple (SSB) en el NRP, evidenciándose así su potencial fotogenotóxico. Adicionalmente, con el fin de revelar la naturaleza de los daños fotoinducidos en las bases del ADN, se utilizaron diferentes enzimas de reparación: endonucleasa III (Endo III) para productos de degradación de bases pirimidínicas, endonucleasa V

(Endo V) para dímeros de timina ciclobutanos, y formamidopirimidina (FPG) para purinas oxidadas. Como se muestra en la Figura 68, tras el tratamiento enzimático no se observaron diferencias significativas, indicando que el daño al ADN generado no es discriminatorio. Sin embargo, no se apreciaron SSB para el N-M1, donde fue necesario quintuplicar la concentración del compuesto para poder apreciarse un daño al ADN cuantificable, revelando así que no presenta fotogenotoxicidad o es prácticamente despreciable.

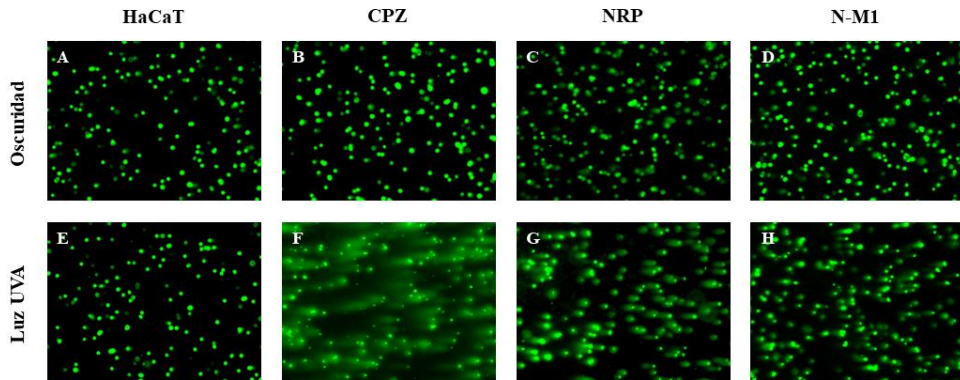
Una vez analizado el daño al ADN, el siguiente paso fue evaluar la fotogenotoxicidad en ADN celular mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas.

### *Evaluación de la fotogenotoxicidad mediante el ensayo cometa.*

Con el fin de evaluar el fotodaño al ADN celular inducido por NRP y/o N-M1, se llevaron a cabo experimentos de ensayo cometa en condiciones alcalinas, el cual permite identificar el daño combinado de SSB, roturas de cadena dobles (DSB) y sitios alcalinos lábiles en el ADN de células individuales<sup>29</sup>. Para este propósito, tras el tratamiento con NRP (1, 5  $\mu\text{M}$ ) o N-M1 (100, 150  $\mu\text{M}$ ) y radiación UVA de 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , las células HaCaT se embebieron en agarosa sobre un portaobjetos para, posteriormente realizar una electroforesis en condiciones alcalinas, permitiendo migrar el ADN dañado y fragmentado fuera del núcleo. Tras la tinción con SYBR® Gold, la fluorescencia de los nucleoides y las colas de ADN se examinaron con microscopía de fluorescencia, utilizando el filtro de fluoresceína FITC y finalmente, se calculó el porcentaje de daño al ADN utilizando un sistema de puntuación visual de 6 categorías diferentes<sup>30</sup>, utilizando CPZ como control positivo.

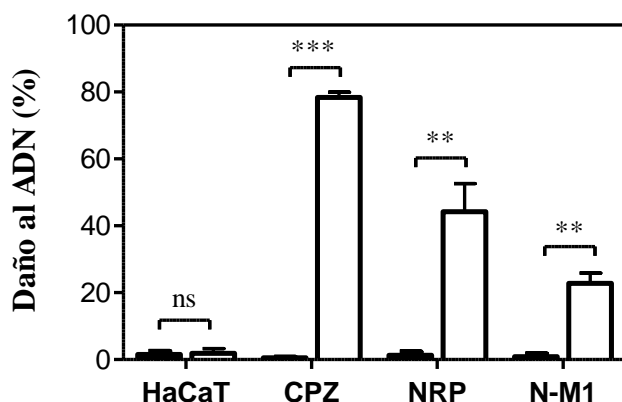
Dado que la muerte celular puede promover en cierta medida la fragmentación del ADN mediante la activación de las ADNasas activadas por caspasas (CADs), se comprobó la viabilidad celular tras la irradiación mediante el ensayo de exclusión del azul de tripán<sup>31</sup> para evitar falsos positivos. La tasa de viabilidad obtenida fue superior al 85 %, indicando la idoneidad tanto de la dosis UVA como de la concentración de los compuestos empleadas<sup>32, 33</sup>.





**Figura 69.** Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia (filtro de fluoresceína FITC) de los experimentos del ensayo cometa. Los queratinocitos (HaCaT) se incubaron solos (A, E), en presencia de CPZ 5  $\mu$ M (B, F), NRP 5  $\mu$ M (C, G) o N-M1 150  $\mu$ M (D, H) en oscuridad (A, B, C, D) o tras irradiación UVA (E, F, G, H).

Los resultados que se muestran en la Figura 69 indican que NRP (G) fue capaz de generar un daño moderado en el ADN de las células (alrededor del 40 %, Figura 70), mientras que el metabolito apenas fue capaz de inducir fotodaño al ADN (H, alrededor del 20 %, Figura 70). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los geles de agarosa del ADN plasmídico (pBR322), donde se evidenció que el N-M1 no era capaz de generar SSB, mientras que el fármaco original sí.



**Figura 70.** Ensayo cometa realizado en condiciones alcalinas. Porcentaje de daño al ADN por recuento visual de células sin tratar (HaCaT) o tratadas con clorpromazina (CPZ, 5  $\mu\text{M}$ ), niraparib (NRP, 5  $\mu\text{M}$ ) o metabolito M1 (N-M1, 150  $\mu\text{M}$ ) en oscuridad (■) o tras irradiación UVA (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , □). Los datos representan la media  $\pm$  s de tres experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias significativas por el test t-Student (ns: no significativo, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## 6.4. Conclusiones.

En resumen, el estudio de este trabajo se ha focalizado en investigar si el inhibidor de la PARP niraparib (NRP) es un fármaco capaz de desencadenar reacciones de fotosensibilización. Para este fin, se han llevado a cabo tanto estudios fotofísicos como ensayos celulares *in vitro*. Además, se ha explorado si el principal metabolito M1 (N-M1) contribuye al fenómeno de la fotosensibilización.

El estudio fotofísico realizado para ambos compuestos permitió revelar diferencias significativas entre los estados excitados singlete y triplete de ambos. El rendimiento cuántico y el tiempo de vida de fluorescencia fueron superiores para el NRP. Por otro lado, tanto para NRP como N-M1, estudios realizados por fotólisis de destello láser en presencia de  $\text{MV}^{2+}$ , revelaron la existencia de una especie transitoria aniónica con una banda de absorción principal a  $\lambda = 470 \text{ nm}$ , cuyo tiempo de vida fue mayor para el metabolito. Además, en N-M1 se observó la contribución de otra

especie transitoria en la misma región del espectro, que se asignó al estado excitado triplete, que se desactiva por oxígeno.

La generación de especies transitorias estaría relacionada con el potencial fototóxico de ambos compuestos, ya que, a partir de los ensayos de captación de rojo neutro, el valor PIF del NRP fue 40, mientras que el de N-M1 se estimó en un valor de 7, al irradiar en la región del UVA, concluyendo que, tanto metabolito como fármaco de partida son compuestos fototóxicos. Esta fototoxicidad puede atribuirse al daño fotosensibilizado hacia las principales biomoléculas celulares (lípidos, proteínas y ADN), como se evidenció mediante los ensayos de oxidación fotosensibilizada de lípidos y de proteínas constituyentes de la membrana celular y del daño fotoinducido al ADN.

Estos resultados revelan que, a pesar de la reducción significativa en el potencial fototóxico del fármaco gracias a su biotransformación en un metabolito con una menor fotorreactividad *in vitro*, ambos compuestos exhiben fototoxicidad tras la radiación UVA. Por tanto, queda patente la necesidad de recomendar pautas de fotoprotección a los pacientes tratados con este fármaco, minimizándose así el riesgo de sufrir reacciones de fotosensibilidad. Además, los ensayos de viabilidad celular MTT en HaCaT y de células de cáncer de ovario (A2780 y A2780cis) revelaron un perfil citotóxico similar en todas las líneas celulares ensayadas, lo que podría sugerir contemplar su uso como fármaco en las terapias fotodinámicas.

## 6.5. Bibliografía.

1. Flaum, N.; Crosbie, E. J.; Edmondson, R. J.; Smith, M. J.; Evans, D. G. *Clin. Genet.* **2020**, 97 (1), 54-63.
2. Pagkali, A.; Mamais, I.; Michalinos, A.; Agouridis, A. P. *Curr. Oncol.* **2022**, 29 (1), 321-336.
3. Herceg, Z.; Wang, Z.-Q. *Mutat. Res.* **2001**, 477 (1), 97-110.
4. Ménissier de Murcia, J.; Ricoul, M.; Tartier, L.; Niedergang, C.; Huber, A.; Dantzer, F.; Schreiber, V.; Amé, J. C.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Sabatier, L.; Chambon, P.; de Murcia, G. *EMBO J.* **2003**, 22 (9), 2255-2263.
5. Ray Chaudhuri, A.; Nussenzweig, A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, 18 (10), 610-621.
6. Loizzi, V.; Ranieri, G.; Laforgia, M.; Gadaleta, C. D.; Gargano, G.; Kardhashi, A.; De Liso, M.; Naglieri, E.; Del Vecchio, V.; Cicinelli, E.; Cormio, G. *Oncol. Lett.* **2020**, 20 (4), 90.
7. Zheng, F.; Zhang, Y.; Chen, S.; Weng, X.; Rao, Y.; Fang, H. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 123, 109661.
8. Jones, P.; Wilcoxon, K.; Rowley, M.; Toniatti, C. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (8), 3302-3314.
9. Scott, L. J., Niraparib: First Global Approval. *Drugs* **2017**, 77 (9), 1029-1034.
10. LaFargue, C. J.; Dal Molin, G. Z.; Sood, A. K.; Coleman, R. L. *Lancet Oncol.* **2019**, 20 (1), e15-e28.
11. Mirza, M. R.; Monk, B. J.; Herrstedt, J.; Oza, A. M.; Mahner, S.; Redondo, A.; Fabbro, M.; Ledermann, J. A.; Lorusso, D.; Vergote, I.; et. al. *N. Engl. J. Med.* **2016**, 375 (22), 2154-2164.
12. Nizialek, E.; Antonarakis, E. S. *Cancer Manag. Res.* **2020**, 12, 8105-8114.

13. van Andel, L.; Zhang, Z.; Lu, S.; Kansra, V.; Agarwal, S.; Hughes, L.; Tibben, M. M.; Gebretensae, A.; Rosing, H.; Schellens, J. H. M.; Beijnen, J. H. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1040*, 14-21.
14. Heo, Y. A.; Duggan, S. T. *Target. Oncol.* **2018**, *13* (4), 533-539.
15. González-Martín, A.; Pothuri, B.; Vergote, I.; DePont Christensen, R.; Graybill, W.; Mirza, M. R.; McCormick, C.; Lorusso, D.; Hoskins, P.; Freyer, G.; et al. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381* (25), 2391-2402.
16. Mateos-Pujante, A.; Jiménez, M. C.; Andreu, I. *Sci. Rep.* **2022**, *12* (1), 3434.
17. Gutiérrez, I.; Bertolotti, S. G.; Biasutti, M. A.; Soltermann, A. T.; García, N. A. *Can. J. Chem.* **1997**, *75* (4), 423-428.
18. Wolszczak, M.; Stradowski, C. *Radiat. Phys. Chem.* **1989**, *33* (4), 355-359.
19. Prasad, D. R.; Hoffman, M. Z.; Mulazzani, Q. G.; Rodgers, M. A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (17), 5135-5142.
20. Krishnamurthy, S.; Lightcap, I. V.; Kamat, P. V. *J. Photochem. Photobiol. A* **2011**, *221* (2), 214-219.
21. Davies, M. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305* (3), 761-770.
22. Baptista, M. S.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; Ghogare, A. A.; Greer, A.; Hamblin, M. R.; Lorente, C.; Nunez, S. C.; Ribeiro, M. S.; Thomas, A. H.; Vignoni, M.; Yoshimura, T. M. *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93* (4), 912-919.
23. Hackbarth, S.; Schlothauer, J.; Preuß, A.; Röder, B. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2010**, *98* (3), 173-179.
24. OECD, Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. **2019**.
25. Shishkova, N.; Kuznetsova, O.; Berezov, T. *Cancer Biol. Med.* **2012**, *9* (1), 9-17.
26. Zhi, W.; Li, S.; Wan, Y.; Wu, F.; Hong, L. *Cancer Cell Int.* **2022**, *22* (1), 18.

27. Laguerre, M.; Lecomte, J.; Villeneuve, P. *Prog. Lipid Res.* **2007**, 46 (5), 244-282.
28. Drummen, G. P. C.; van Liebergen, L. C. M.; Op den Kamp, J. A. F. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33 (4), 473-490.
29. Collins, A. R. *Methods Mol. Biol.* **2002**, 203, 163-177.
30. Møller, P. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2006**, 612 (2), 84-104.
31. Strober, W. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, 111, A3.B.1-a3.B.3.
32. Azqueta, A.; Collins, A. R. *Arch. Toxicol.* **2013**, 87 (6), 949-968.
33. Glej, M.; Schneider, T.; Schlörmann, W. *Arch. Toxicol.* **2016**, 90 (10), 2315-2336.

# **CAPÍTULO 7**

---

Conclusiones





La presente tesis doctoral se ha centrado en evaluar el potencial fotoquímico y fotobiológico *in vitro* de los inhibidores de la PARP, fármacos empleados en la terapia contra el cáncer, combinando tanto estudios fotofísicos como fotobiológicos en biomoléculas modelo y cultivos celulares, concretamente en queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT). Así, tras un cribado inicial de los cinco inhibidores de la PARP que componen la tercera y última generación (rucaparib, talazoparib, niraparib, olaparib y veliparib), los dos últimos se descartaron por presentar una absorción muy baja en la región UVA y, por tanto, difícilmente podrían inducir reacciones de fotosensibilidad. El estudio *in vitro* de la fototoxicidad celular y la fotorreactividad se centró en los que sí poseían esa capacidad, cuyo estudio se describe en profundidad en los capítulos cuatro, cinco y seis de esta tesis. De esta forma, para cada uno de ellos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Sobre el rucaparib (RCP):

- El RCP es un fármaco fototóxico con un valor de factor de fotoirritación (PIF) de 41 obtenido por el ensayo de captación de rojo neutro (NRU).
- Tras irradiación UVA en medio orgánico, el rucaparib sufre una desaminación oxidativa para dar lugar a un aldehído que resulta ser un fotoproducto estable.
- Mediante la fluorescencia intrínseca del fármaco se ha podido evidenciar que el RCP una vez internalizado en células sigue una distribución perinuclear.
- Tras irradiar el fármaco en células, se generan especies reactivas de oxígeno detectables por microscopía de fluorescencia, que podrían desencadenar un daño por estrés celular.
- La foto(geno)toxicidad generada tras la excitación del fármaco con luz UVA es debida al daño causado tanto al ADN celular como a las proteínas transmembrana, como indican los ensayos cometa y la derivatización de grupos carbonilo con DNPH, respectivamente.
- El RCP genera un fotodaño significativo irreversible al ADN celular.

- El mecanismo de muerte celular inducido por rucaparib tras irradiación con luz UVA es la apoptosis.

2. Sobre el talazoparib (TLZ):

- El TLZ es un fármaco fototóxico con un valor de PIF de 7, obtenido por el ensayo de NRU.
- El estado excitado singlete del TLZ tiene un rendimiento cuántico y tiempo de fluorescencia bajos, con valores de  $\phi_F = 0,12$  y  $\tau_F < 1 \mu s$  en disolución acuosa aireada.
- Por espectroscopía de absorción transitoria se detecta el estado excitado triplete, que presenta un máximo de absorción a  $\lambda = 400$  nm en PBS. Su tiempo de vida en atmósfera inerte es de 8,8  $\mu s$ .
- Tras irradiación UVA, el talazoparib en medio acuoso sufre una fotooxidación, originando un fotoproducto que extiende la banda de absorción hacia el visible, hasta 610 nm.
- El fotoproducto obtenido resultó no ser fluorescente y, además, tras someterlo a fotólisis de destello láser no se detectaron especies transitorias, lo que puede relacionarse con la ausencia de fototoxicidad, tanto en el rango UVA como en el visible.
- En acetonitrilo, un disolvente que emula el entorno lipofílico de las células, el TLZ es capaz de generar oxígeno singlete detectable a 1270 nm.
- Tras irradiar el fármaco en células, se generan especies reactivas de oxígeno detectables por microscopía de fluorescencia, que podrían desencadenar un daño por estrés celular.
- El daño fototóxico generado tras la excitación del fármaco con luz UVA es debido principalmente a las proteínas transmembrana y al daño fotoinducido al ADN, lo que lo convierte además en un fármaco fotogenotóxico.
- El TLZ genera un daño fotooxidativo irreversible al ADN celular.

---

### 3. Sobre el niraparib (NRP) y su principal metabolito (N-M1):

- Tanto NRP como N-M1 son fototóxicos, con valores de PIF de 46 y 6, respectivamente. Estos valores obtenidos por el ensayo de NRU indican que el fármaco original es más fototóxico que su metabolito principal.
- El metabolito N-M1 sufre un ligero desplazamiento batocrómico de la banda principal de absorción respecto al fármaco de partida, mientras que su rendimiento cuántico de emisión y su tiempo de vida de fluorescencia se reducen a la mitad. Las energías del primer estado excitado singlete son prácticamente idénticas en ambos compuestos.
- Tras la irradiación UVA de los compuestos en medio acuoso, se observó fotodegradación, la cual fue más rápida para el metabolito.
- En ambos compuestos, por fotólisis de destello láser, se detectó una especie transitoria que se asignó a una especie aniónica ( $\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$ ) en base a su desactivación con  $MV^{2+}$ . El tiempo de vida de esta especie fue superior para el metabolito respecto al fármaco de partida. En el caso de N-M1 se observó también la presencia de una segunda especie transitoria que se asignó a un triplete en base a su desactivación por oxígeno. Este triplete tiene un tiempo de vida inferior al de la especie aniónica.
- En acetonitrilo, N-M1 es capaz de generar oxígeno singlete detectable a 1270 nm, lo que no sucedió para NRP.
- Los ensayos de viabilidad celular MTT en células HaCaT y de cáncer de ovario (A2780 y A2780cis) revelaron un perfil citotóxico similar en todas las líneas celulares ensayadas, lo que podría sugerir contemplar su uso como fármaco en las terapias fotodinámicas. Además, no se apreciaron diferencias significativas en los valores de  $IC_{50}$  tras irradiación UVA entre las líneas celulares.

- El daño fototóxico generado tras la excitación de NRP con luz UVA es debido principalmente al daño fotooxidativo al ADN celular, a las proteínas transmembrana y, en menor medida, a lípidos de membrana. Por contra, en el metabolito el daño que se aprecia fundamentalmente es en las proteínas de membrana.
- El daño fotoinducido al ADN celular generado por NRP y revelado por electroforesis en gel de agarosa no discriminó de la formación de dímeros de timina, de la oxidación de bases pirimidínicas o de purinas oxidadas. En el N-M1 este daño es prácticamente despreciable. Además, el ensayo cometa confirmó que el fármaco es potencialmente fotogenotóxico.

Finalmente, con todo ello se concluye que estos fármacos de la familia de los inhibidores de la PARP (RCP, TLZ y NRP) son capaces de inducir reacciones de fotosensibilidad, con valores de factor de fotoirritación (PIF) de 41, 7 y 46, respectivamente, siendo el TLZ el fármaco con el menor potencial fototóxico de los tres ensayados. Esto podría atribuirse a su rápida fotoconversión en un fotoproducto que resultó no ser fotorreactivo.

# **ANEXOS**

---



---

## PUBLICACIONES Y PARTICIPACIONES EN CONGRESOS

### Publicaciones

1. A. Mateos-Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Evaluation of Phototoxicity induced by the anticancer drug rucaparib. *Sci. Rep.* **2022**, 12 (1): 3434.
2. A. Mateos-Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Assessment of the PARP inhibitor talazoparib photosafety profile (enviado a *Biomedicine & Pharmacotherapy*).
3. A. Mateos Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Photobehaviour of the anticancer drug niraparib and its main metabolite. An integrated approach combining photophysics and photobiological studies (en preparación).

### Participaciones en congresos

1. A. Mateos Pujante, V. Vendrell-Criado, C.A. Angulo Pachón, J. F. Miravet, F. Galindo, I. Andreu, M.C. Jiménez. Photoreactivity of sulfasalazine in microheterogeneous media. IX Reunión de Química Orgánica del Mediterráneo (REQOMED), octubre 2019, Murcia (España), póster.
2. A. Mateos Pujante, V. Vendrell-Criado, C.A. Angulo Pachón, J. F. Miravet, F. Galindo, I. Andreu, M.C. Jiménez. Photochemistry of sulfasalazine in microheterogeneous media. XVI Simposio de Jóvenes Investigadores Químicos, noviembre 2019, Valencia (España), póster.
3. A. Mateos-Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Photogenotoxicity induced by rucaparib. AEBIN photochemistry school, septiembre 2020, San Sebastián (España) formato online, póster.
4. A. Mateos-Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Assessment of the Phototoxicity induced by talazoparib. 19<sup>th</sup> congress of the European Society for Photobiology, septiembre 2021, Salzburgo (Austria) formato online, póster.

5. A. Mateos-Pujante, M.C Jiménez, I. Andreu. Niraparib: another PARP inhibitor. XXXVIII Reunión bienal de la Sociedad Española de Química, junio 2022, Granada (España), póster.
6. A. Mateos-Pujante, M.C. Jiménez, I. Andreu. Peering into the photobehavior of the new PARP inhibitors. X Reunión de Química Orgánica del Mediterráneo (REQOMED), octubre 2022, Valencia (España), póster.





OPEN

# Evaluation of phototoxicity induced by the anticancer drug rucaparib

Alejandro Mateos-Pujante<sup>1,2</sup>, María Consuelo Jiménez<sup>1,2,3</sup> & Inmaculada Andreu<sup>1,2,3</sup>

Rucaparib (RCP) is a potent selective inhibitor of both PARP-1 and PARP-2 enzymes that induces synthetic lethality in cancer cells. It is used for the treatment of breast and ovarian tumors harboring deleterious germline or somatic cancer susceptibility genes mutations. Although RCP has an indole chromophore in its structure, it displays a bathochromic shift of the absorption band towards the UVA region of sunlight, thus extending the active fraction of solar light able to produce photosensitizing reactions. In this context, it is highly interesting to study the photogenotoxicity disorders associated with this drug, bearing in mind that, for dermatologists it is crucial to understand the toxicity mechanism to improve clinical management. In the present work, RCP has shown to be potentially phototoxic, as observed in the neutral red uptake phototoxicity test. Moreover, this significant phototoxicity is attributed to both proteins and genomic DNA, as revealed in the protein photooxidation and comet assays. The results obtained are highly relevant concerning RCP photosafety and become clinically important in the context of identification of the cutaneous adverse events that can be associated with the targeted therapies. Interestingly, this is the first example of a PARP inhibitor able to induce photosensitized damage to biomolecules.

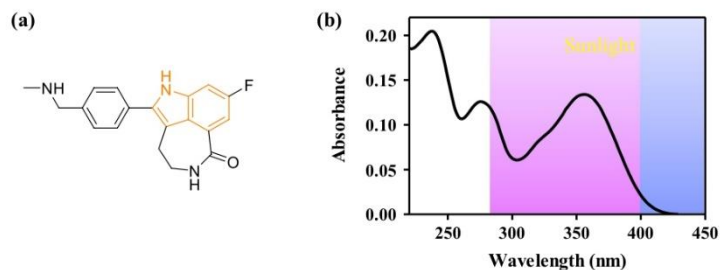
Cancer is one of the most prevalent diseases and the second leading cause of death worldwide. Notably, among the treatments for this pathology, cancer chemotherapy has been the major pharmacological advance in the last few decades. However, the drugs used for this purpose have a narrow therapeutic index, and often the response produced is just palliative. In contrast, the more recently introduced targeted therapy inhibits a specific molecular target, usually a protein with a critical role in tumor growth or progression, and therefore it has more limited nonspecific toxicities.

In this context, Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors have emerged as promising antitumoral targeted therapies<sup>1,2</sup>.

The poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are a large family of multifunctional enzymes that catalyze the transfer of ADP-ribose to target proteins. They are involved in cellular processes such as modulation of chromatin structure, transcription, replication, recombination, and DNA repair<sup>3</sup>. The most abundant PARPs, PARP-1 and PARP-2, play an essential role in DNA single-strand break repair (SSB) via the base excision repair (BER) pathway<sup>4</sup>. An efficient SSB repair is essential for cell survival. In this sense, PARP inhibition results in the accumulation of unrepaired SSB, leading to collapsed replication forks and DNA double-strand breaks (DSB) that are toxic to cells, and the homologous recombination repair (HRR) pathway, in which BRCA1 and BRCA2 genes are key elements, is essential to repair such lesion during cell replication<sup>5</sup>. Thus, inhibition of PARP enzymes is a potentially lethal therapeutic strategy, consisting of provoking chromosomal uncertainty, cell-cycle arrest, and subsequent apoptosis, which seems to be attributable to the persistence of DNA lesions that are normally repaired by homologous recombination<sup>4,6</sup>.

Rucaparib (RCP) is a potent selective inhibitor of both PARP-1 and PARP-2, which induces synthetic lethality in cancer cells that are not able to repair DNA damage by the HRR pathway. It is especially used, for the treatment of breast and ovarian tumors harboring deleterious germline or somatic cancer susceptibility genes (BRCA) mutations<sup>7–11</sup>. Recently, rucaparib has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with deleterious BRCA mutation associated with metastatic castrate-resistant prostate cancer (mCRPC)<sup>12</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. <sup>2</sup>Unidad Mixta de Investigación Universitat Politècnica de València-Instituto de Investigación Sanitaria (IIS), La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain. <sup>3</sup>email: mcjimene@qim.upv.es; iandreur@qim.upv.es



**Figure 1.** (a) Chemical structure of rucaparib (RCP). (b) Absorption spectrum of RCP 20  $\mu$ M in PBS. The spectrum was drawn using GraphPad Prism v5.03.

Generally, RCP is well tolerated by patients but some adverse events can occur, including fatigue, dizziness, gastrointestinal disorders, thrombocytopenia, neutropenia, itching and skin sensitivity to sunlight<sup>13</sup>. With this background, the present work aims to investigate photodamage to biochemical targets in living cells, using a methodology previously developed in our group to study photosensitivity reactions induced by drugs and metabolites<sup>14–18</sup>.

From a photobiological point of view, although RCP has an indole chromophore in its structure, it displays a bathochromic shift of the absorption band towards the region of sunlight, (UVA) being able to induce photosensitivity (Fig. 1). Therefore, it appears necessary to investigate the RCP photosensitivity disorders (phototoxicity and photogenotoxicity), contributing to a better understanding of the photosensitivity phenomena. These findings will help dermatologists to improve clinical management in oncologic patients.

## Methods

**General.** All solvents were commercially available (HPLC grade) and were used without further purification. Rucaparib (RCP, CAS no. 283173-50-2) was purchased from Cymit Química S.L. (Barcelona, Spain). Sodium dodecyl sulphate (SDS, CAS no. 151-21-3) chlorpromazine hydrochloride (CPZ, CAS no. 69-09-0) and 5-hydroxydiclofenac (5-OH DCF, CAS no. 69002-84-2) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). RCP and 5-OH DCF stock solutions were prepared in DMSO as vehicle, while CPZ and SDS were directly dissolved in ultrapure water (Milli-Q). 6, 12, 24 and 96-well plates were acquired from Labclinics (Barcelona, Spain). Albumin from human serum lyophilized powder, essentially fatty acid free (HSA, CAS no. 70024-90-7), 1,4-dibicyclo-[2.2.2]-octane (DABCO), sodium hydroxide, and Tris(hydroxymethyl)aminomethane were acquired from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Agarose D1 low EEO was acquired from Condalab (Madrid, Spain). Trichloroacetic acid (TCA) was purchased from Labbox (Barcelona, Spain). EDTA was supplied by Honeywell Fluka (North Carolina, USA) (Valencia, Spain) and 2,4-dinitrophenylhydrazine hydrochloride was provided by Cymit Química S.L. (Barcelona, Spain). 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, SYBR Gold DNA and CellMask Orange Plasma stains were supplied by Invitrogen (Madrid, Spain). RedDot Far-red nuclear stain was acquired from Biotium (California, USA). Apo-one Homogeneous Caspase-3/7 assay kit and human immortalized keratinocyte cell line were supplied by ThermoFisher Scientific (Madrid, Spain).

For cell culture experiments, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low glucose, phenol red), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low glucose, no glutamine, no phenol red), fetal bovine serum (FBS) and penicillin–streptomycin ( $1 \times 10^5$  U/mL,  $1 \times 10^5$   $\mu$ g/mL) were supplied by Invitrogen (Madrid, Spain). Trypsin–EDTA (0.25–0.02%) and glutamine (100  $\mu$ M) solutions were provided by Cultek (Madrid, Spain). Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, 0.01 M) and neutral red dye were obtained from Sigma-Aldrich. Comet assay lysis solution and flare slides were purchased from R&D systems (Minneapolis, USA).

**Cell culture conditions.** Human keratinocytes (HaCaT) were cultured in 75 cm<sup>2</sup> plastic flasks in DMEM with phenol red supplemented with 10% FBS, 4 mM L-Glutamine and penicillin–streptomycin (100 U/mL, 100  $\mu$ g/mL) in a humidified incubator (100% relative humidity) at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Splitting cells were done twice a week with 1:5 and 2:5 ratios.

**Absorption and emission spectra measurements.** Ultraviolet absorption spectra were recorded on a Jasco V-650 UV/Vis spectrophotometer. Measurements were performed in PBS at room temperature using 1 cm quartz cells with 3.5 mL capacity.

Fluorescence in solution and within cells ( $\lambda_{exc}$  = 320 nm) were recorded using a Synergy H1 multi-mode microplate reader in 96-well black plates.

**Irradiation equipment.** For all in vitro photosensitization assays, an LCZ-4 photoreactor (Luzchem, Canada), fitted with 14 Hitachi lamps for top and sides ( $\lambda_{max} = 350$  nm, Gaussian distribution), was used as the UVA light source. Irradiations were carried out using different transparent plates: 96-well (for phototoxicity and cascade-3/7 activation assays), 24-well (for comet assays), 12-well (for ROS assay) and 6-well (for photooxidation assays) plates and they were performed through the lid of the plates, attenuating the direct effect of UVB radiation over the cell cultures. Before performing the experiments, the absorption of the plastic lid of the plates was measured using the microplate reader described above. It was determined that the plastic lid filters all radiation below 310 nm, which contributes to the mitigation of the effect of UVB radiation over the cell cultures. Moreover, to avoid overheating, plates were kept on ice inside the photoreactor.

In photogenotoxicity experiments, cell viability of cultures after irradiation was checked by trypan-blue dyeing to ensure that the results obtained were not false-positive results triggered by DNA fragmentation due to cell death.

**Cellular targeting by confocal microscopy.** Human keratinocytes were seeded on glass coverslips in 24-well plates (25,000 cells/well). Next day, cells were incubated in fresh DMEM medium with RCP 20  $\mu$ M for 60 min, CellMask Orange Plasma membrane stain (dilution 1:10,000) for 30 min and RedDot Far-Red nuclear stain (dilution 1:200) for 10 min. Then, coverslips were washed three times with PBS and mounted in glass slides with a solution of Mowiol, containing 2.5% 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane (DABCO). Microscopy and imaging have been done with a Leica SP5 confocal microscope with a sequential mode. The excitation wavelengths for RCP, membrane stain and nuclear stain were 405, 543 and 662 nm, respectively, and emission wavelengths were 480, 567 and 694 nm. Representative images were chosen among two different coverslips from different regions of each slide.

**In vitro phototoxicity assay: neutral red uptake (NRU).** Phototoxicity test was performed according to the OECD guideline 432<sup>19</sup> using HaCaT cells instead of BALB/c 3T3 fibroblasts cells employed in the standard procedure, owing to the similarity with human skin cells<sup>20</sup>.

Briefly, two 96-well plates were seeded for each compound (20,000 cells/well). The following day, culture media was replaced with the free phenol red DMEM to avoid ultraviolet absorption for itself. Then, cells were treated with test compounds at eight concentrations, ranging from 2.5 to 500  $\mu$ M, and incubated for 1 h in dark conditions. After that, one plate was irradiated at a 5 J/cm<sup>2</sup> UVA radiation dose under the conditions described above, whereas the other one was kept in dark conditions. Immediately, all compound solutions were replaced with DMEM medium and plates were incubated overnight. The next day, neutral red solution (50  $\mu$ g/mL) was added to all wells and incubated for 2 h. Cells were washed once with PBS and neutral red absorbed was extracted from lysosomes in 100  $\mu$ L with a fresh extraction buffer [Milli-Q water, ethanol and acetic acid 50% (v/v), 49.5% (v/v), 0.5% (v/v), respectively]. Absorbance results were recorded at 550 nm on a Synergy H1 microplate reader and, for all compounds, dose–response curves were made by Boltzmann fitting with GraphPad Prism v.5.03. Thus, it could be determined the concentration of RCP and controls by which the neutral red uptake is reduced to 50% (IC<sub>50</sub>) in dark and UVA light conditions. Finally, the photoirritation factor (PIF) values were calculated using the Eq. (1):

$$PIF = \frac{IC_{50} (Dark)}{IC_{50} (UVA\ light)} \quad (1)$$

Based on the OECD Guideline, a compound is predicted as phototoxic if PIF > 5, probably phototoxic if PIF  $\geq$  2 and < 5 and non-phototoxic if PIF < 2. As positive and negative controls, CPZ and SDS were used, respectively.

**In vitro reactive oxygen species (ROS) detection upon UVA irradiation.** To investigate oxidative stress-induced phototoxicity, ROS activation assay was performed using a pro-fluorescent substrate (carboxy-H<sub>2</sub>DCF-DA), which is deacetylated (carboxy-H<sub>2</sub>DCF) by cellular esterases and then, it is subsequently oxidized by ROS to 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (carboxy-DCF), a fluorescent compound unable to run away from the intracellular matrix.

For this experiment, HaCaT cells were seeded in two 12-well plates (40,000 cells/well). Next day, cells were incubated in fresh free phenol red DMEM with increasing amounts of RCP (2, 5 and 10  $\mu$ M) for 1 h in dark conditions. After that, one of them was irradiated at a 5 J/cm<sup>2</sup> UVA light dose under the conditions described above, keeping the other one in dark conditions. Afterward, media was replaced by a solution of 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy-H<sub>2</sub>DCF-DA, 25  $\mu$ M) in PBS and incubated for 30 min ( $\lambda_{exc} = 495$  nm,  $\lambda_{em} = 525$  nm). Finally, all wells were washed twice in PBS and fluorescence images were acquired with a Leica DMI 4000B fluorescence microscopy using the Fluorescein FITC filter. Representative images were chosen among two different wells from different regions of each condition.

**Protein carbonyl content test.** Detection of carbonylated proteins was carried out following the protein carbonyl derivatization assay through 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)<sup>21</sup>, with minor modifications. Briefly, solutions of HSA (1 mg) in PBS (200  $\mu$ L) were prepared in the absence or in the presence of 5 or 10  $\mu$ M of RCP and irradiated with a UVA dose of 5, 10 and 15 J/cm<sup>2</sup>, or in dark conditions. Immediately, 200  $\mu$ L of DNPH 10 mM was added to the samples, mixed with vortex and kept in darkness at room temperature for 60 min. Then, 1 mL of TCA (20% v/v) was added to protein samples, incubated on ice for 15 min, vortex mixed and centrifugated at 13,000 rpm for 5 min. Next, supernatants were discarded and pellets were washed twice with 1 mL of ethanol/ethyl acetate 50:50 (v/v), containing TCA 20%, mixed by vortex and centrifugated again in order

to remove any free DNPH. Protein pellets were dried in a heater at 60 °C for 15 min to allow complete solvent evaporation and resuspended in 100  $\mu$ L of 6 M guanidine hydrochloride. Once protein pellets were completely dissolved (stayed overnight at 4 °C), absorbance at 375 nm was recorded using the Synergy H1 microplate reader and carbonyl contents were expressed as nmol of carbonyl per mg protein according to Eq. (2):

$$\text{Carbonyl content} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \cdot 100}{6.364} \quad (2)$$

where 6.364 is the  $\epsilon$  at 375 nm  $\times$  l (the length of the path light for a 96-well plate).

**Assessment of nuclear DNA damage by comet assay.** The single cell gel electrophoresis assay, also known as comet assay, was performed following the methodology previously described<sup>18</sup> with slight modifications. Cells were trypsinized, resuspended in PBS and placed on ice for 2 h to allow HaCaT cells to repair mild DNA damage induced by trypsin. Then, cells (50,000 cells/well in two 24-well plates) were seeded and treated with RCP (2, 5, 10, 50  $\mu$ M) or chlorpromazine (CPZ, 4, 10  $\mu$ M), which it was used as a positive control. After 30 min of the incubation at 4 °C in darkness, one plate was placed in the photoreactor in order to irradiate the cells on ice (2 or 5 J/cm<sup>2</sup>), whereas the other one was kept in the absence of light as negative control. Next, 100  $\mu$ L of each cell suspension were mixed carefully with 100  $\mu$ L of 1% low melting point agarose solution and drops were loaded onto Trevigen treated slides and placed on ice-cold tray to allow its jellification. In parallel, cell viability after irradiation was checked by trypan blue exclusion assay<sup>25</sup>. Then, the slides were immersed in coupling jars containing cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100 in distilled water and pH 10) and overnight incubated at 4 °C to promote cell lysis. Next day, all slides were placed in a Trevigen comet assay electrophoresis tank, covered with 1 L of cold alkaline electrophoresis buffer (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA in distilled water reaching a pH  $\geq$  13). The electrophoresis was run at 21 V ( $\approx$  300 mA) for 30 min at 4 °C. When the electrophoresis finished, the slides were washed twice with Milli-Q water for 5 min; DNA was fixed by slide incubation in 70% ethanol for 5 min followed by other 5 min in 100% ethanol and dried in a heater at 37 °C for 2 h. Finally, comet nucleoids and tails were stained by incubating the slides in a SYBR Gold (1:10,000 TE buffer) bath for 30 min, washed once with Milli-Q water, air dried, and kept in darkness until further visualization. Leica DMI 4000B fluorescence microscope was used for nucleoids and tails DNA visualization, and at least five pictures were taken for each sample. Finally, DNA % in tail as a measure of DNA damage was calculated for each condition with the analysis of at least 100 DNA comets by visual scoring, utilizing the open-source counter software ImageJ v1.52p. Total comet score (TCS) was determined with the classification of six DNA damage categories<sup>23</sup> with the following Eq. (3):

$$TCS = \frac{\sum_{n=1}^6 \text{class } n \text{ comet} \times n}{6} \quad (3)$$

The final results were denoted in 1–100 arbitrary units, where class 0 comets show no DNA damage and class 6 comets indicate the maximum DNA damage.

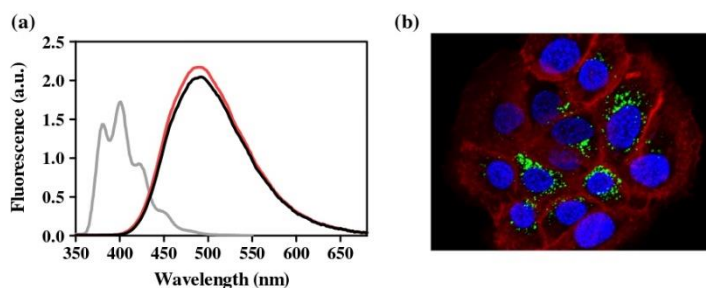
Additionally, to determine if cell culture were able to repair the DNA damage promoted by compounds + UVA light, 5-OH DCF (100  $\mu$ M) was used as recovery positive control<sup>16,17</sup>. Thus, before the cellular lysis, slides were embedded with DMEM, freed of supplements, and incubated at 37 °C for 6 h. Then, slides were immersed in the same lysis buffer for at least 2 h to allow cellular lysis and the same procedure was followed as describe above.

**Caspase-3/7 activation assay.** In brief, two 96-well plates were seeded (20,000 cells/well). Next day, culture media was replaced with free phenol red DMEM to avoid absorption for itself. Then, cells were treated with RCP at 0.25, 1 or 3  $\mu$ M and incubated for 1 h in dark conditions. After that, one plate was irradiated at a 5 J/cm<sup>2</sup> UVA radiation dose, whereas the other one was kept in dark conditions. Immediately, all solutions were replaced with DMEM medium and plates were incubated overnight. The following day, 100  $\mu$ L of caspase-3/7 substrate (bis-N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide; Z-DEVD-R110), diluted in Apo-one Homogeneous Caspase-3/7 Buffer (R&D Systems) was added to each well and incubated for 4 h. Then, fluorescence of rhodamine 110 released by caspase activity was monitored using a Synergy H1 microplate reader in 96-well black plates ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 528 nm).

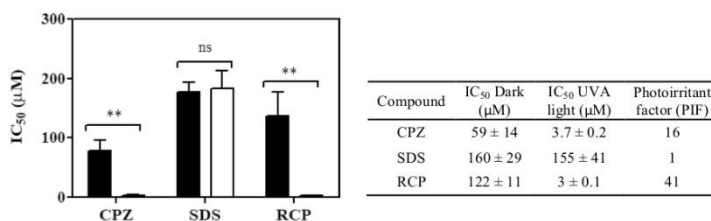
**Data analysis and statistics.** Results obtained are expressed as mean  $\pm$  standard deviation from at least four independent experiments. Data were analyzed and regression methods were developed using GraphPad Prism version 5.03 for Windows (<https://www.graphpad.com>). Statistical significance was calculated by the Student's *t* test, considering only *p* values lower than 0.05 as significant results (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001). Images were analyzed using ImageJ version 1.52p for Windows (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

## Results and discussion

**Cellular internalization of RCP.** Firstly, emission spectrum of RCP was recorded in both PBS and cells to check that its intrinsic fluorescence could be used for confocal microscopy experiments. For this purpose, HaCaT culture was treated with RCP to ensure both the uptake by cells and fluorescence properties after internalization. Emission spectra ( $\lambda_{\text{exc}}$  = 320 nm) of RCP was recorded in PBS solution and after internalization into HaCaT cells and the fluorescence quantum yield ( $\phi_f$ ) was determined in presence and absence of cells (Fig. 2a) by comparison with anthracene in ethanol as standard<sup>24</sup>. Hence, RCP showed an intracellular fluorescence with a maximum emission around 480 nm and  $\phi_f$  = 0.696  $\pm$  0.018, which is similar to that observed in aqueous solution ( $\phi_f$  = 0.651  $\pm$  0.021). As expected for the chemical structure of RCP (heterocyclic amide, fluorine and aromatic



**Figure 2.** (a) Emission spectra ( $\lambda_{exc} = 320$  nm) of rucaparib (RCP) after internalization on HaCaT cells (red), RCP in PBS solution (black) and anthracene (grey) in ethanol. The latter was used as standard. Isoabsorptive solutions for all conditions were prepared and then, fluorescence was recorded. (b) Intracellular localization of RCP in HaCaT cells by confocal microscopy. Keratinocytes, seeded on glass coverslips, were incubated with  $20 \mu\text{M}$  solutions of RCP (green) and labelled with CellMask Orange Plasma membrane (red) and RedDot1 Far-Red nuclear (blue). Colours were chosen arbitrarily. Emission spectra were drawn using GraphPad Prism v5.03.



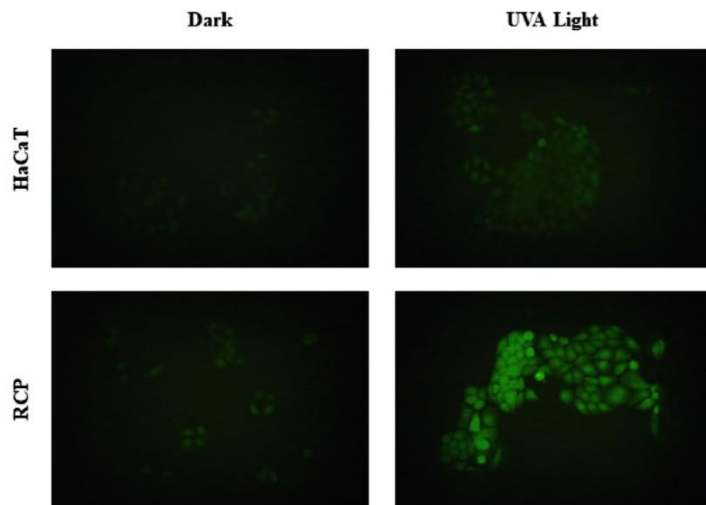
**Figure 3.** In vitro NRU phototoxicity assay of rucaparib (RCP). IC<sub>50</sub> values were established from dose–response curves and PIF values from the ratio of IC<sub>50</sub> under dark or light conditions. For positive and negative controls, chlorpromazine (CPZ) and sodium dodecyl sulphate (SDS) compounds were used, respectively. Data represent mean ± SD of four independent experiments performed in triplicate upon dark (■) or UVA light (□) conditions. Asterisks indicate significant differences by Student's *t* test (*ns* non-significant, \*\**p* < 0.01). Data were analyzed using GraphPad Prism v5.03. According to the OECD 432 guideline (2019), PIF < 2 means “no phototoxicity”, 2 < PIF < 5 means “probable phototoxicity” and PIF > 5 means “phototoxicity”.

ring linked to core indole), its fluorescence spectrum undergoes a substantial redshift in comparison with the indole moiety that is similar to tryptophan<sup>25</sup>.

Hence, confocal microscopy was employed in order to analyze the intracellular localization of RCP using its intrinsic fluorescence properties and CellMask Orange Plasma and RedDot Far-Red to stain membrane and nucleus, respectively. In this context, 405, 543 and 662 nm were used as excitation wavelengths for RCP, membrane stain and nuclear stain, respectively. As emission wavelengths, 480, 567 and 694 nm were selected for RCP, membrane stain and nuclear stain, respectively. After 1 h of incubation, an efficient uptake by HaCaT cells was observed, showing a perinuclear distribution as it was illustrated in Fig. 2b.

**Cellular phototoxicity assessment of RCP.** *In vitro neutral red uptake, NRU.* A phototoxicity test was performed to evaluate the phototoxic potential of RCP in combination with UV radiation. For this purpose, cell viability of HaCaT cells treated with increasing concentrations of RCP was measured, using neutral red as a vital dye, under dark or UVA light conditions. Therefore, the half-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) were determined from dose–response curves (Fig. S1). Finally, the photoirritation factor (PIF), which corresponds to the ratio of the IC<sub>50</sub> under dark or light conditions, was calculated using the Eq. (1).

The results obtained are shown in Fig. 3, where RCP was shown to be clearly phototoxic (IC<sub>50</sub> Dark = 122 ± 11 µM, IC<sub>50</sub> UVA light = 3 ± 0.1 µM), with a PIF value of ca. 41, three times higher than chlorpromazine (CPZ) value, which was used as a positive control. Although RCP was significantly less damaging than CPZ within dark conditions, both drugs exhibit similar IC<sub>50</sub> (3 and 3.7 respectively) after UVA irradiation, in agreement with the highest RCP PIF value.



**Figure 4.** Representative fluorescence microscopy images (Fluorescein FITC filter) of ROS experiments. Human keratinocytes (HaCaT) were seeded on 12-well plates and incubated in the presence (10  $\mu\text{M}$ ) or absence of rucaparib (RCP); HaCaT cells were treated with 25  $\mu\text{M}$  of 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (carboxy- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ). Dark: Non-irradiated cells. UVA Light: cells irradiated with UVA Light (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ).

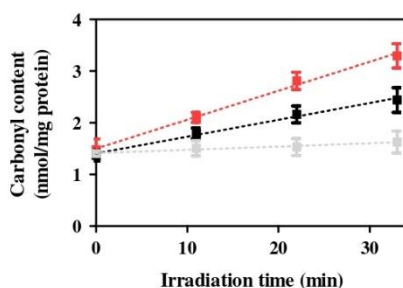
Induced drug phototoxicity can provoke damage to cells, especially to key cellular components including lipid, protein, and DNA. Bearing in mind that lipid photoperoxidation was not observed using the thiobarbituric acid (TBA) method<sup>26,27</sup> (Fig. S2); probably the higher phototoxicity observed could be attributed to both proteins and genomic DNA.

**In vitro ROS generation by rucaparib.** Taking into consideration that RCP displays toxicity under sunlight exposure, it seems interesting to explore the possibility of reactive oxygen species (ROS) generation after UVA radiation, which can be responsible for the oxidation of biological molecules and cell membranes.

To this purpose, cells were staining with carboxy- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  after incubation with different concentrations of RCP and irradiated with a UVA light dose of 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Finally, to analyze ROS activity, the fluorescence of carboxy-DCF was recorded by means of fluorescence microscopy using a Fluorescein FITC filter. Images displayed on the left in Fig. 4 illustrate that ROS noticed in dark conditions are negligible in both the absence or presence of RCP. This fact is as expected since the  $\text{IC}_{50}$  for RCP under dark conditions was found to be 122  $\mu\text{M}$ . Moreover, when cells are irradiated with a UVA dose of 5  $\text{J}/\text{cm}^2$ , the lack of fluorescence signal in non-treated cells indicates the suitability of the experiment (photograph on the right and up). In contrast, after cells treatment with RCP (10  $\mu\text{M}$ ) followed by irradiation, a broad fluorescence signal was registered, which exhibits the capability of RCP to induce ROS after UVA radiation (photograph on the right and bottom).

To a deeper investigation, another set of experiments was conducted using 2, 5 and 10  $\mu\text{M}$  as concentrations of RCP. Results are available in the supporting section (see Fig. S3), where it can be appreciated an increase of ROS production as the drug concentration increases as well.

**Protein photooxidation.** Protein carbonylation represents the most frequent and usually irreversible oxidative modification affecting proteins. It is known that RCP binds to plasma protein, and therefore it makes sense to determine protein photooxidation by the measurement of the carbonyl content, as an early biomarker of oxidative damage, using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization method. In this context, PBS solutions containing HSA (0.075  $\mu\text{M}$ ) and RCP (5 or 10  $\mu\text{M}$ ) were irradiated with different UVA light doses (5, 10 and 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) and subsequently carbonyl content was measured. For each RCP concentration, carbonyl concentration generated in situ was fitted to a zero-order kinetic; the levels of carbonyl moiety were directly propor-



**Figure 5.** Protein photooxidation by rucaparib (RCP) determined by the measurement of the carbonyl content using the DNPH derivatization method. HSA solutions (0.075  $\mu\text{M}$ ) in the absence (grey) or in the presence of RCP at 5  $\mu\text{M}$  (black) or 10  $\mu\text{M}$  (red) were irradiated at different irradiation times. Linear regressions were established using GraphPad Prism v5.03.

tional to the amount of UVA dose. The irradiation dose has been calculated by the Eq. (4), where the irradiance can be established multiplying the reading of a power meter detector by the calibration factor.

$$\text{Irradiation dose} \left( \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) = \frac{\text{Irradiation time (min)} \cdot \text{Irradiance} \left( \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 60}{1000} \quad (4)$$

Rate constant values (k) for RCP at 5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  were found to be 0.033 and 0.056 nmol-min/mg protein, respectively.

Moreover, taking into account that HSA absorption in the UVA region is negligible, both dark and irradiated conditions contained similar levels of carbonyl moiety; this indicates the suitability of the UVA dose employed to prevent false-positive results.

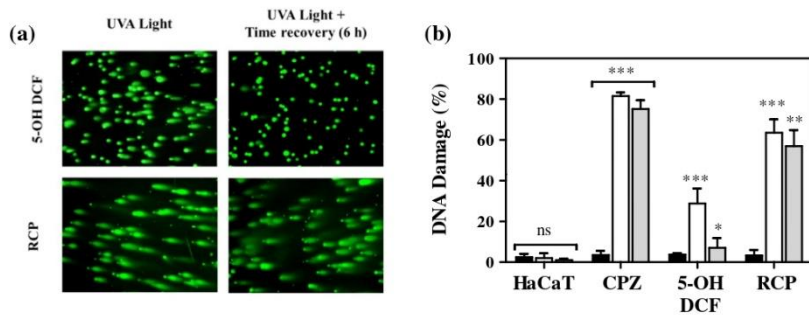
As shown in Fig. 5 and Fig. S4, RCP increased significantly the carbonyl concentration in HSA after UVA irradiation (up to threefold), clearly pointing out the capability of this drug to promote photooxidation in cellular membranes. These results are in agreement with those obtained by the NRU test, in which RCP exhibited substantial phototoxicity.

**Photogenotoxicity of RCP.** Comet assay under alkaline conditions is a well-known technique employed to reveal single-strand breaks (SSB), double-strand breaks (DSB) and alkali-labile sites on chromosomal DNA of an individual cell<sup>28</sup>. Thus, for detecting DNA photodamage in single cells, human keratinocytes were incubated for 30 min with RCP. Then, they were exposed for 5 min at UVA irradiation (2 J/cm<sup>2</sup>) and embedded in agarose on a slide. To avoid misleading results as cell death also promotes DNA fragmentation by activation of caspase-activated DNases (CADs), cell viability after treatment plus irradiation was routinely assessed by trypan blue exclusion assay<sup>22</sup>, giving a viability rate higher than 85%, which indicates the suitability of the UV dose and drug concentration chosen. Thus, this is in agreement with that reported from the literature, where it is indicated that the cell viability has to be at least 70–80% to ensure reliable comet assay results<sup>29,30</sup>.

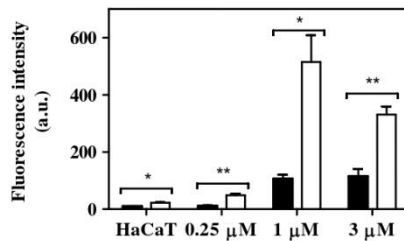
Next, alkaline electrophoresis was carried out to allow the damaged and fragmented DNA to migrate away from the nucleus. Upon staining with SYBR Gold, the fluorescence of the comet nucleoids and tails were analyzed by a fluorescence microscope using the Fluorescein FITC filter. Percentage of DNA damage was calculated using the visual scoring (six DNA damage categories)<sup>33</sup> of at least 100 DNA comets.

As displayed in Fig. 6 and Fig. S5, comet assay revealed significant damage promoted by RCP in combination with UVA light (around 60%). To combat DNA damage, cells have developed several DNA-repair pathways; however, if the repair is defective DNA lesions may lead to mutations. Therefore, to assess whether the HaCaT cells can repair photoinduced damage to DNA by RCP, an additional set of comet assays were carried out after irradiation followed by 6 h cell recovery. It is remarkable that after 6 h of time recovery, no substantial reduction in nuclear DNA damage was noticed, indicating non-reversible DNA damage.

Furthermore, to compare the photosensitized DNA damage generated using lower concentrations of RCP close to its IC<sub>50</sub> (2, 5, and 10  $\mu\text{M}$ ), a new set of experiments was carried out using the same UVA dose that the employed for cell viability NRU assay. Despite the conditions were different, as it can be observed comparing both experiments (50  $\mu\text{M}$  at 2 J/cm<sup>2</sup> and 5–10  $\mu\text{M}$  at 5 J/cm<sup>2</sup>), a good correlation was obtained, determining in both cases a percentage of DNA damage around 60%. More details are available in the supporting information (Fig. S6).



**Figure 6.** Unexposed HaCaT cells alone or treated with 10  $\mu\text{M}$  of chlorpromazine (CPZ, positive control), 100  $\mu\text{M}$  of 5-hydroxydiclofenac (5-OH DCF, recovery positive control) or 50  $\mu\text{M}$  of rucaparib (RCP). Cells were kept on dark conditions or irradiated with a 2  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA dose. **(a)** Representative fluorescence microscopy images of cells treated with RCP or 5-OH DCF. **(b)** Percentage of DNA damage by visual scoring of untreated cells (HaCaT) or treated with CPZ, 5-OH DCF or RCP. Data represent mean  $\pm$  SD of four independent experiments upon dark (■), UVA light (□) or UVA light + 6 h of time recovery (◻) conditions. Asterisks indicate significant differences by Student's *t* test (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ , ns non-significant). Visual scoring of DNA damage was established using ImageJ v1.52p. The percentage of DNA damage was represented using GraphPad Prism v5.03.



**Figure 7.** Relative fluorescence of rhodamine 110 ( $\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$ ) after caspase-3/7 activation assay by cells treated with rucaparib (RCP). Cells unexposed (HaCaT) or treated with 0.25, 1 or 3  $\mu\text{M}$  of RCP were kept on dark conditions (■) or irradiated at a 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA dose (□) and subsequently incubated with Z-DEVD-R110 for 4 h. Data represent mean  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate upon dark or UVA light conditions. Asterisks indicate significant differences by Student's *t* test (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ). Data were analyzed using GraphPad Prism v5.03.

**Cellular apoptosis induced by RCP.** Caspase-3/7 activation assay was performed to investigate the molecular mechanism of cell death<sup>31</sup> induced by RCP in combination with UVA radiation. Thus, apoptosis is a well-known mechanism of “programmed cell death”, where caspase-3/7 activities are responsible for this event and their overexpression conducts irreversibly to the cellular death. In this context, the activity of caspase-3/7 was quantified by a pro-fluorescent substrate (Z-DEVD-R110) that in the presence of caspase enzymes releases a highly fluorescent compound, rhodamine 110 (R110). Hence, cellular apoptosis was determined indirectly by the measurement of the R110 fluorescence intensity after its release by cells treated with different concentrations of RCP. As shown in Fig. 7, an increase of caspase-3/7 activity was observed after cell treatment with RCP and subsequently UVA radiation. It is interesting to note that the caspase-3/7 maximal activity is observed at 1  $\mu\text{M}$  of RCP, which corresponds to a concentration lesser than its UVA  $\text{IC}_{50}$  (3  $\mu\text{M}$ ). However, when this concentration is closed to its  $\text{IC}_{50}$ , the enzyme activity is reduced due to the phototoxicity of the drug that provokes cell death in end.



## Conclusion

In summary, the present work has demonstrated that the anticancer drug RCP has the ability to trigger photosensitivity reactions. On one hand, the in vitro NRU cell viability test has proven the high phototoxic potential of RCP. This phototoxicity can be attributed to photosensitized damage towards main cellular biomolecules (lipids, proteins and DNA). Accordingly, lipid photo peroxidation assessed by the thiobarbituric acid method is negligible. Moreover, RCP photosensitized oxidation of HSA is established using the protein carbonylation method, and the photodamage to DNA induced by RCP is revealed using the comet assay. Thus, RCP results to be both phototoxic and photogenotoxic.

On the other hand, RCP is able to generate reactive oxygen species after UVA radiation, which could lead to stress-oxidative damage to subsequent cell death. In this context, the apoptosis cell death mechanism induced by combining RCP and UVA radiation is noted by experiments with caspases.

It is worth noting that the results are highly relevant concerning RCP photosafety and they result clinically interesting to identify the cutaneous adverse events associated with targeted therapies. Besides, this is the first example of a PARP inhibitor able to induce photosensitized damage to biomolecules. The employed methodology can be extended to other PARP inhibitors in order to assess possible photo(geno)toxicity reactions.

Received: 6 August 2021; Accepted: 10 February 2022

Published online: 02 March 2022

## References

- Somenblich, A., de Azambuja, E., Azim, H. A. Jr. & Piccart, M. An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 27–41 (2015).
- Michelena, J. et al. Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. *Nat. Commun.* **9**, 2678 (2018).
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517–528 (2006).
- Cetin, B., Wahl, C. A. & Gumusay, O. The DNA damaging revolution. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **156**, 103117 (2020).
- Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. & Engelward, B. P. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* **6**, 923–935 (2007).
- Well, M. K. & Chen, A. P. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer. *Curr. Probl. Cancer* **35**, 7–50 (2011).
- Cortes, L., Rugo, H. S. & Jackisch, C. An overview of PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Target Oncol.* **16**, 255–282 (2021).
- Zheng, F. et al. Mechanism and current progress of poly ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors in the treatment of ovarian cancer. *Biomed. Pharmacother.* **123**, 109661 (2020).
- Drew, Y. et al. Phase 2 multicentre trial investigating intermittent and continuous dosing schedules of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor rucaparib in germline BRCA mutation carriers with advanced ovarian and breast cancer. *Br. J. Cancer* **114**, 723–730 (2016).
- Mariappan, L., Jiang, X. Y., Jackson, J. & Drew, Y. Emerging treatment options for ovarian cancer: Focus on rucaparib. *Int. J. Womens Health* **9**, 913–924 (2017).
- O’Cearbhaill, R. E. Using PARP inhibitors in advanced ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)* **32**, 339–343 (2018).
- Anscher, M. S. et al. FDA approval summary: Rucaparib for the treatment of patients with deleterious BRCA-mutated metastatic castrate-resistant prostate cancer. *Oncologist* **26**, 139–146 (2021).
- Ledermann, J. A. et al. Rucaparib for patients with platinum-sensitive, recurrent ovarian carcinoma (ARIEL3): Post-progression outcomes and updated safety results from a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **21**, 710–722 (2020).
- Vayá, I. et al. Characterization of locally excited and charge-transfer states of the anticancer drug lapatinib by ultrafast spectroscopy and computational studies. *Chem. Eur. J.* **26**, 15922–15930 (2020).
- García-Lainez, G., Vayá, I., Marin, M. P., Miranda, M. A. & Andreu, I. In vitro assessment of the photo(geno)toxicity associated with lapatinib, a tyrosine kinase inhibitor. *Arch. Toxicol.* **95**, 169–178 (2021).
- Agúndez, J. A. G., García-Martín, E., García-Lainez, G., Miranda, M. A. & Andreu, I. Photomutagenicity of chlorpromazine and its N-demethylated metabolites assessed by NGS. *Sci. Rep.* **10**, 6879 (2020).
- García-Lainez, G. et al. Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **341**, 51–55 (2018).
- Palumbo, F. et al. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **313**, 131–137 (2016).
- OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 (2019).
- Svobodová, A. R., Ulířchová, J. & Vostálová, J. Human keratinocyte cell line as a suitable model for in vitro phototoxicity testing. *An. Bras. Dermatol.* **94**, 105–106 (2019).
- Colombo, G. et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B.* **1019**, 178–190 (2016).
- Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **111**, A3.B.1–A3.B.3 (2015).
- Müller, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res. Rev. Mutat.* **612**, 84–104 (2006).
- Melhuish, W. H. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* **65**, 229–235 (1961).
- Kosatz, S. et al. Direct imaging of drug distribution and target engagement of the PARP inhibitor rucaparib. *J. Nucl. Med.* **59**, 1316–1320 (2018).
- Seto, Y., Inoue, R., Kato, M., Yamada, S. & Onoue, S. Photosafety assessments on pifenedone: Photochemical, photobiological, and pharmacokinetic characterization. *J. Photochem. Photobiol. B* **120**, 44–51 (2013).
- Zeb, A. & Ullah, F. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fried fast foods. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, 9412767 (2016).
- Collins, A. R. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol. Biol.* **203**, 163–177 (2002).
- Azqueta, A. & Collins, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* **87**, 949–968 (2013).
- Glei, M., Schneider, T. & Schlörmann, W. Comet assay: An essential tool in toxicological research. *Arch. Toxicol.* **90**, 2315–2336 (2016).

31. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).

#### Acknowledgements

The present work was supported by: the Spanish Government (PID2019-105391GB-C22, PID2020-115010RB-I00 and BEAGAL 18/00211) and Generalitat Valenciana (ACIF/2018/153 fellowship for A. M-P). We would also like to thank IIS La Fe Microscopy Unit for technical assistance.

#### Author contributions

A.M.P. performed the experiments and prepared the figures. M.C.J. and I.A. supervised the experiments and wrote the manuscript. I.A. conceived and coordinated the work.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.


#### Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07319-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to M.C.J. or I.A.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

---

# Assessment of the PARP inhibitor talazoparib photosafety profile

Alejandro Mateos-Pujante<sup>1,2</sup>, M. Consuelo Jiménez<sup>1,2\*</sup>, Inmaculada Andreu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

<sup>2</sup>Unidad Mixta de Investigación Universitat Politècnica de València -Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia, Spain.

\*Correspondence should be addressed to M. C. J. (mcjimene@qim.upv.es) or I. A. (iandreur@qim.upv.es).

ORCID A. Mateos-Pujante: 0000-0003-1571-7162

ORCID M.C. Jiménez: 0000-0002-8057-4316

ORCID I. Andreu: 0000-0003-3409-9443

## Acknowledgements

We thank the Agencia Estatal de Investigación (PID2020-115010RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 and the Generalitat Valenciana (CIAICO/2021/061 and ACIF/2018/153 fellowship for A. M.-P.).

## Abstract

Talazoparib (TLZ) is a poly(adenosine diphosphate [ADP]-ribose) polymerase inhibitor employed for the treatment of breast cancer. This drug displays an absorption band in the UVA region, and therefore investigation of the possible phototoxic side-effects associated to its administration results of enormous relevance. In this context, we describe here a photochemical and photobiological study to ascertain the photosafety profile of TLZ. Concerning transient species, the singlet and triplet excited states of TLZ were detected by fluorescence ( $\lambda_{\max \text{ em}} = 440 \text{ nm}$ ) and laser flash photolysis experiments ( $\lambda_{\max \text{ abs}} = 400 \text{ nm}$ ),

respectively. Remarkably, UVA TLZ irradiation with UV light in aqueous solution resulted in formation of a stable photooxidated product, TLZ-P, whose absorption band is extended until the visible region. From *in vitro* experiments, phototoxicity was revealed for the parent drug by neutral red uptake (NRU) assays, with a PIF value of *ca* 7; besides, TLZ induced formation of reactive oxygen species (ROS) and produced significant damage to both proteins and DNA. By contrast, the singlet and triplet excited states of TLZ-P were not detected, and no photodamage was observed in the NRU experiments. Overall, the results indicate that TLZ induces phototoxicity, whereas its photoproduct exhibits photosafety.

### **Keywords**

Comet assay, Fluorescence microscopy · Protein photooxidation · Photoproduct · Phototoxicity · Reactive oxygen species.

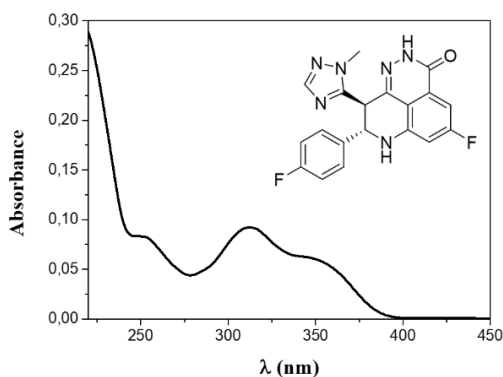
## 1. Introduction

Poly(adenosine diphosphate [ADP]-ribose) polymerases (PARPs) are a family of enzymes involved in a variety of cellular processes, including DNA repair, transcription regulation, apoptosis, and necrosis [1-3]. Specifically, PARP1 and PARP2 are members of this family that play critical roles in the DNA single-strand breaks (SSBs) repair [4, 5]. This function is inhibited by PARP inhibitors (PARPis), which have demonstrated their ability to decrease the proliferation of cancer cells, containing mutations in homologous recombination (HR) DNA repair deficiency, such as *BRCA1* or *BRCA2* genes [6, 7]. In this context, PARPis provoke synthetic lethality that consist of the formation and accumulation of double-strand breaks (DSB) and, thus, cells deficient in *BRCA1/2* genes are unable to repair this DNA damage by HR, causing cellular death [8]. To understand the cytotoxic effects displayed by anticancer PARPis, this family of drugs has been investigated using multidimensional fluorescence microscopy, revealing mechanisms of sensitivity and resistance [9].

Talazoparib ((8S,9R)-5-fluoro-8-(4-fluorophenyl)-9-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-2,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrido[4,3,2 de]phthalazin-3-one, TLZ, inset in Figure 1) is a PARPi developed by Pfizer and approved in 2018 in USA and 2019 in EU for the treatment of germline *BRCA*-mutated, HER2-negative breast cancer [6, 10]. In this context, a randomized phase 3 trial in patients with advanced breast cancer and a germline *BRCA1/2* mutation revealed a significant benefit in the treatment with TLZ over the standard chemotherapy [11]. Thus, considering patient treated-reported outcomes for TLZ that displayed a tolerable safety profile, TLZ was incorporated into the routine management of germline *BRCA*-mutated locally advanced/metastatic breast cancer [12]. However, according to a proteomic study, TLZ could not overcome resistance to treat triple-negative breast cancer cells [13]. In addition, TLZ is also used in patients with various solid tumors [14, 15], in metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) [16] and has been considered a new candidate for the treatment of glioblastoma, since it produces radiosensitization effects in radioresistant glioblastoma cancer stem cells combined with high linear energy transfer irradiation [17]. Studies regarding the nanoformulation of this drug noted that the formulation would allow for a more extended release of the drug delivered intraperitoneal to the disease site, which could offer a therapeutic advantage over the oral delivery administration [18]. In this context,

from a pharmacokinetic point of view, metabolism of TLZ was negligible in humans, and renal excretion is the main route of elimination [14].

Although TLZ has a manageable tolerability profile in patients, it presents side effects, including fatigue, nausea, vomiting, diarrhea, anorexia, headache, alopecia, skin disorders, anemia, neutropenia and thrombocytopenia. The uncommon but potentially severe adverse events include myelodysplastic syndromes, marked myelosuppression and embryo-fetal toxicity [10]. In connection with adverse reactions, we have previously reported that rucaparib, another PARPi, induces cellular phototoxicity [19]. With this background, and taking into account that TLZ displays an absorption band in the UVA region, we decided to investigate its photobehavior and photobiological properties through *in vitro* studies in human skin cells (HaCaT keratinocyte cells) and proteins to advise photoprotection guidelines to patients if required and, thus, minimize the photosensitizing risk from the drug.



**Fig. 1.** Absorption spectrum of talazoparib 10  $\mu\text{M}$  in PBS. Inset: chemical structure of talazoparib.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemical and Reagents

All chemicals and solvents employed were of the highest purity available from their commercial house and used without further treatments. Specifically, Talazoparib (TLZ, CAS 1207456-01-6) was purchased from TargetMol.

For cell culture experiments, human immortalized keratinocyte (HaCaT) cell line was acquired from ThermoFisher Scientific. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), containing low glucose, L-glutamine, phenol red and penicillin-streptomycin solution ( $1 \times 10^5$  U/mL,  $1 \times 10^5$   $\mu$ g/mL) were supplied by Invitrogen. Fetal bovine serum (FBS) and trypsin-EDTA (0.25-0.02 %) were acquired from Cultek. Human serum albumin fatty acid free (HSA), phosphate buffer saline (PBS) tablets and neutral red dye solution were purchased from Sigma-Aldrich.

## 2.2. Cell culture experiments

Human immortalized keratinocytes were cultured in plastic flasks with a surface area of 75 cm<sup>2</sup> and grown in DMEM supplemented with 10 % FBS, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin in a humidified incubator at 37 °C at 5 % CO<sub>2</sub>. Splitting cells were routinely done twice a week with 1:5 and 2:5 ratios and prior to each experiment, the viability of cell cultures was checked by the trypan blue exclusion assay [20].

## 2.3. Photophysical measurements

Absorption spectra were registered on a Jasco V-650 UV/Vis spectrophotometer in PBS at room temperature, using 1 cm quartz cuvettes.

Steady-state fluorescence measurements in PBS solution were recorded on a Jasco FP-8500 spectrofluorometer system equipped with a monochromator in the wavelength range of 200 – 850 nm at room temperature, using 1 cm quartz cuvettes, while a Synergy H1 multi-mode microplate reader in 96-well black plates was employed when working with cells.

Time-resolved fluorescence lifetimes (PBS, room temperature 1 cm quartz cuvettes) were measured using an EasyLife X system, which included a sample compartment with an automated peltier cuvette holder for temperature control (set to 25 °C), a pulsed LED excitation source and a lifetime detector. The wavelength of the excitation source was  $\lambda = 310$  nm, and a WG370 emission filter was employed.

Phosphorescence spectra were obtained in ethanol using an Edinburg spectrofluorometer FS5 outfitted with a 150 W CW Ozone-free Xenon arc lamp and a SC-70 module with liquid nitrogen EPR Dewar. The samples were placed in 5 mm quartz tube diameter and cooled at 77 K through liquid nitrogen. The excitation wavelength was  $\lambda = 300$  nm.

Laser flash photolysis (LFP) measurements were executed with a pulsed Nd YAG L52137 V LOTIS TII laser at  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm (Sp Lotis TII, Minsk, Belarus), where the single pulse duration was approximately 10 ns with an energy of 12 mJ per pulse. The LFP system was also equipped with a 77 250 Oriel monochromator and a Tektronix DP04054 oscilloscope. The absorbance of the samples was set to 0.30 at  $\lambda = 355$  nm and solutions were deaerated by bubbling nitrogen over 15 minutes. Experiments were accomplished in PBS at room temperature, using 1 cm quartz cuvettes.

The triplet excited state quenching constant by oxygen ( $k_q$ ) was determined employing the Stern-Volmer equation (1), where  $\tau$  and  $\tau_0$  correspond to the triplet lifetime in the absence or presence of quencher ( $O_2$ ), respectively.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q \cdot [O_2] \quad (1)$$

#### 2.4. Irradiation equipment

Irradiation experiments were performed in a Luzchem multi-lamp LCZ-4 photoreactor equipped with six top and eight side Hitachi lamps ( $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm, Gaussian distribution, Luzchem, Canada). Preparative irradiation was performed in a covered beaker under stirring. The course of the reaction was followed by absorption and fluorescence spectroscopies. For cellular culture experiments [neutral red uptake (NRU), comet, reactive oxygen species (ROS)] and protein carbonylation assays, irradiations were conducted in well-transparent plates to mitigate the effect of UVB radiation during the experiments since the plastic lid filters all radiation below 310 nm. Moreover, plates were kept on ice to avoid overheating during the experiment.

The irradiation dose was calculated using Eq. 2, where the irradiance is obtained by multiplying the powermeter detector reading by the calibration factor.

$$\text{Irradiation dose} \left( \frac{J}{\text{cm}^2} \right) = \frac{\text{Irradiation time (min)} \cdot \text{Irradiance} \left( \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right) \cdot 60}{1000} \quad (2)$$

#### 2.5. Steady-state irradiation and photoproduct isolation

Irradiation of TLZ (20 mg) was carried out in PBS (200 mL) at room temperature for 30 min, under stirring. The crude reaction was then lyophilized, washed with ethyl acetate (100 mL)



and filtered. The solid was taken and stirred with ethyl acetate-methanol (80:20, 3×20 mL). After filtration, the liquid phase was evaporated *in vacuo*, to afford a magenta viscous oil. Final purification was done by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a reverse phase column (C18 mediterranea™ sea, 25×1 cm), methanol-acetonitrile 50:50 v:v as mobile phase and a flow of 2 mL/min. The purification process was monitored by UV detection at 254 nm.

The isolated photoproduct (TLZ-P) was characterized by NMR spectroscopy (Bruker Advance 400 spectrometer) and high-resolution mass spectrometry [HRMS (ESI-TOF), QTOF spectrometer coupled with an UPLC BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μM), ESI source in positive ionization at 1.9 kV].

5-fluoro-8-(4-fluorophenyl)-6-hydroxy-9-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-2,7-dihydro-3H-pyrido[4,3,2-de]phthalazin-3-one (TLZ-P): <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.09 (s, 1H), 7.70 (d, *J* = 11.6, 1H), 7.47-7.43 (m, 2H), 7.13-7.09 (m, 2H), 3.64 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) 180.3, 178.5, 167.1, 165.6, 163.2, 159.5, 152.4, 151.6, 150.6, 138.8, 136.3, 133.2, 132.5, 119.4, 118.1, 117.9, 116.2, 115.3, 98.1, 36.5, 24.2. HRMS (ESI-TOF): *m/z* calculated for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [MH<sup>+</sup>] 395.1068, found [MH<sup>+</sup>] 395.1064. See Fig. S1 in Online Resource for further details.

## 2.6. Neutral red uptake (NRU) assay

The phototoxicity test was executed in accordance with the OECD guideline 432 [21] with minor modifications: the assays were performed employing human immortalized keratinocytes (HaCaT) rather than BALB/c 3T3 fibroblasts since their similarity with human skin cells has already been reported [22], and irradiations were performed in free phenol red DMEM to avoid UV absorption by phenol red. In brief, cells were seeded in two 96-well plates for each compound at a density of 2 × 10<sup>4</sup> cells/well. The next day, the culture media was replaced with free phenol red DMEM and cells were subsequently treated with TLZ or TLZ-P at eight different concentrations ranging from 2.5 to 500 μM, where SDS and CPZ were used as negative and positive controls, respectively. After 1 hour of incubation, one plate was exposed to a 5 J/cm<sup>2</sup> UVA radiation dose under the described conditions, while the other was kept in the dark. All compound solutions were immediately replaced with DMEM medium and plates were incubated overnight. The next day, 20 μL of a neutral red solution

(50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) was added to all wells and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Then, cells were washed once with PBS and neutral red was extracted from lysosomes by adding 100  $\mu\text{L}$  of a fresh extraction buffer (50 % Milli-Q water, 49.5 % ethanol, 0.5 % acetic, v:v). Absorbance values were registered at 550 nm on a Synergy H1 microplate reader and, for each compound, dose-response curves were plotted by non-linear regression to obtain the  $\text{IC}_{50}$  values (compound concentration resulting in a 50 % reduction in the neutral red uptake) in dark and UVA light conditions with GraphPad Prism 5.03 software. Finally, the photoirritation factor (PIF) values were calculated using the next equation (3).

$$PIF = \frac{IC_{50}(\text{dark})}{IC_{50}(\text{UVA})\text{light}} \quad (3)$$

In accordance with the OECD Guideline, a compound is predicted as phototoxic if PIF is higher than 5, probably phototoxic if PIF lies between 2 and 5, and non-phototoxic if PIF is lower than 2.

Additionally, given that TLZ-P absorbs light in the visible region, another NRU experiment was carried out employing 14 LZC-LGR visible light lamps ( $\lambda_{\text{max}} = 520$  nm, Gaussian distribution, Luzchem, Canada), to check if the photoproduct was able to induce phototoxicity under these conditions. For this purpose, rose bengal (RB) was used as the positive control [23] instead of CPZ, whereas SDS was maintained as the negative control.

### 2.7. Reactive oxygen species (ROS) detection

To evaluate oxidative-stress induced phototoxicity, the quantity of ROS produced by TLZ after UVA radiation was measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ), a profluorescent probe that, after penetrating cell membrane, is deacetylated by intracellular esterases to produce 2',7'-dichlorodihydrofluorescein ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ).  $\text{H}_2\text{DCF}$  fluoresces when it is oxidized by ROS to yield 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) [24].

Keratinocytes were seeded into two 12-well plates ( $4 \times 10^4$  cells/well). After 24 h, the culture media was replaced with free phenol red DMEM containing TLZ (85 or 100  $\mu\text{M}$ ) and incubated for 1 h. Then, one plate was irradiated at a 5  $\text{J}/\text{cm}^2$  UVA dose, while the other was kept in the darkness. Afterward, TLZ was removed by replacing the media with a  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  solution (25  $\mu\text{M}$ ) in PBS and incubated for 30 min in dark. Finally, cells were washed twice with PBS and fluorescence images were retrieved using a Leica DMI 4000B

fluorescence microscopy ( $\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ ) employing the Fluorescein FITC filter. Representative images were selected from two different wells in different regions of each condition.

## 2.8. Photoinduced protein oxidation assay

Detection of protein carbonyl formation photoinduced by TLZ was assessed by means of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization assay [25] with slight modifications, using human serum albumin (HSA) as a protein model. Summarily, HSA solutions (5 mg/mL) in PBS were prepared, incubated with increasing concentrations of TLZ (65, 75, 85  $\mu\text{M}$ ) at room temperature for 1 h and irradiated with increasing concentrations of a UVA dose (0, 5, 10, 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Immediately after, samples were treated with DNPH (200  $\mu\text{L}$ , 10 mM) and incubated in darkness at room temperature for 1 h to allow the formation of dinitrophenyl hydrazone adducts. Proteins were subsequently precipitated by adding trichloroacetic acid (TCA, 1 mL, 20 % v/v), incubated on ice for 15 min and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Then, after discarding the supernatants, pellets were washed twice by adding a solution of ethanol/ethyl acetate (1 mL, 50:50, v/v), containing 20 % TCA to remove the unbound DNPH, and dried at 60  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min to fully evaporate the solvent. Finally, adducts were then solved in guanidine hydrochloride (100  $\mu\text{L}$ , 6 M) overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$  and absorbance at 375 nm was recorded using the Synergy H1 microplate reader. The degree of HSA oxidation was expressed as nmol of carbonyl content per mg protein according to the equation (4):

$$\text{Carbonyl content} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{mg protein}} \right) = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) \cdot 100}{6.364} \quad (4)$$

Where the value of 6.364 corresponds to  $\epsilon$  at 375 nm x 1 (the length of the path light for a 96-well plate).

## 2.9. Alkaline comet assay

The well-known single-cell electrophoresis assay (comet assay) was carried out as previously described, [26] with minor modifications. Cells were harvested, resuspended in PBS and placed on ice for 2 h to allow keratinocytes to repair mild DNA damage induced by trypsin detachment. Subsequently, cells were seeded in two 24-well plates (5 x 10<sup>4</sup> cells/well), treated with TLZ (85  $\mu\text{M}$ ) or the positive control (CPZ, 5  $\mu\text{M}$ ) and incubated at 4  $^{\circ}\text{C}$  for 30

min in darkness. Then, one plate was exposed to a 5 J/cm<sup>2</sup> UVA radiation dose, while the other was kept in dark conditions as negative control. After mixing 100 µL of each suspension with 100 µL of 1 % low melting point agarose solution, droplets were poured into Trevigen treated slides and placed on an ice-cold tray to allow them to gel. The slides were then submerged inside coupling jars filled with a lysis buffer [19] and finally they were maintained at 4 °C overnight to permit cell lysis.

The following day, the electrophoresis was set up at ≈ 300 mA (corresponding to 21 V) over 30 min at 4 °C in a Trevigen comet assay electrophoresis tank, loaded with all slides and coated with 1 L of alkaline electrophoresis buffer cooled [19]. At the end of electrophoresis, slides were washed twice with distilled water for 5 min. DNA was fixed by two subsequent incubations in 70 % and 100 % ethanol solutions over 5 min each and dried in a heater at 37 °C for 2 h. Afterward, DNA nucleoids and tails were stained with SYBR Gold [1:10,000 dilution in TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA)] for 30 min at 4 °C in darkness, washed once with Milli-Q water, air-dried and kept in darkness until further visualization. Finally, DNA nucleoids and tails were visualized using a Leica DMI 4000B fluorescence microscope ( $\lambda_{exc} = 490$  nm), picking five pictures per condition. The percentage of DNA damage in each sample was determined by visual scoring of at least 100 DNA comets, utilizing the ImageJ 1.52 software and total DNA damage was established with the classification of six DNA categories [27] according to equation (5).

$$DNA\ damage\ (\%) = \frac{\sum_{n=0}^6 n\ class\ comet\ x\ n}{6} \quad (5)$$

To investigate if cells were able to repair DNA damage generated by TLZ upon UVA radiation, a set of recovery experiments were performed. Thus, prior to the cellular lysis, slides were maintained in non-supplemented DMEM medium at 37 °C for 6 h and then lysed as stated above. For this purpose, 5-hydroxydiclofenac (5-OH DCF, 100 µM) was used as recovery positive control [28].

## 2.10. Data analysis and statistics

Results obtained are presented as mean ± standard deviation (SD) from at least three independent experiments. Chemical structures were drawn with the ChemDraw software (version 18.1). Spectroscopy measurements were plotted using the OriginPro software

(version 9.0). Regression methods were developed using the GraphPad software (version 5.0). Visual scoring of comet assay experiments was analyzed by the ImageJ software (version 1.52). RMN experiments were represented and analyzed by the MestReNova software (version 6.0.2). Statistical significance was assessed by the Student's t-test, considering only  $p$  values lower than 0.05 as significant result ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ).

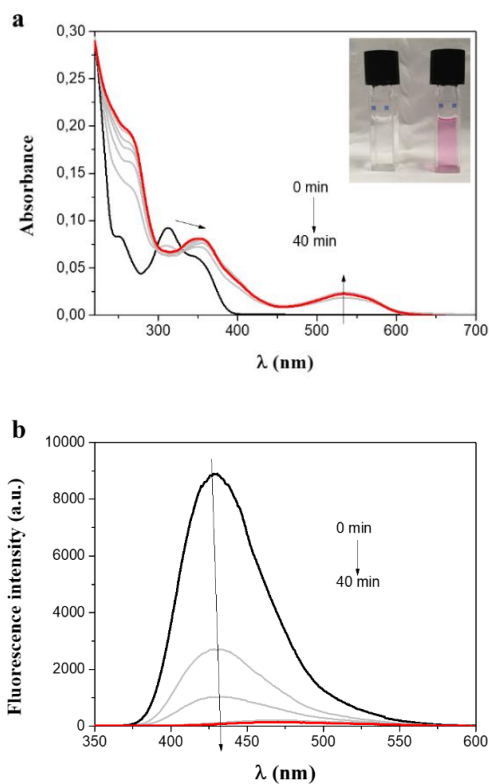
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Irradiation of TLZ in aqueous medium

The UV-Vis absorption spectrum of TLZ (Figure 1) shows that the drug absorbs light in the UVA region (315-400 nm). Since 95 % of UVA sunlight is not filtered by ozone layer and reaches the Earth's surface, investigation of the UVA-induced reactivity of TLZ is a relevant issue in connection with possible drug-mediated phototoxic side-effects. After sunlight absorption, photogenerated transient species derived from TLZ could be reactive towards cell or biomolecules causing damage and/or evolving to photoproducts formation, which potential phototoxicity also would deserve to be tested.

Before addressing the biological assays, the photoreactivity of the drug was investigated in aqueous media at the same pH as the biological environment. Thus, a TLZ 20  $\mu\text{M}$  PBS solution was irradiated in a photoreactor with lamps centered at  $\lambda = 350$  nm. The process was monitored by following the changes in the absorption (Fig. 2a) and fluorescence spectra (Fig. 2b) at increasing irradiation times.

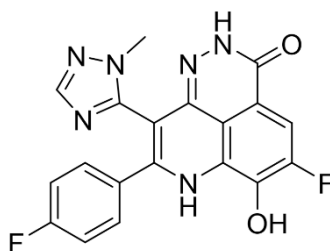
In the absorption measurements, the TLZ spectrum before irradiation (black trace) exhibited two maxima at  $\lambda = 310$  and  $\lambda = 350$  nm that disappeared after 40 min of irradiation, concomitant with the appearance of a new band with maxima at  $\lambda = 540$  nm, extended until 610 nm (red trace). This feature was detectable at naked eye (Fig. 2a inset), as a change from non-colored (non-irradiated solution) to pink (after 40 min irradiation) suggesting transformation of TLZ in new photoproduct(s). Substantial changes were also observed in the fluorescence spectra, where the initial band of TLZ, centered at  $\lambda = 440$  nm, decreased with increasing irradiation times (gray traces), until became almost negligible after 40 min irradiation time (red trace).



**Fig. 2.** Changes in the TLZ spectra (20  $\mu\text{M}$  in PBS) after irradiation at  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, from 0 min (black) to 40 min (red). **a:** Absorption spectra. **b:** Fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm). Inset: TLZ/PBS solution after 0 min (left) and 40 min (right) irradiation.

To isolate and characterize the possible photoproduct(s), a preparative irradiation was performed: thus, 20 mg of TLZ were suspended in 200 mL of PBS and irradiated for 30 min in a photoreactor at  $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm, under stirring. After liquid-liquid extraction with ethyl acetate-methanol (80:20) and evaporation of the solvent (see Materials and Methods section for further details), the resulting crude was purified by HPLC (1:1 MeOH/MeCN as eluent), affording only one photoproduct (TLZ-P). The HRMS spectrum obtained by EI gave a  $\text{MH}^+$  peak at 395.1064 uma, corresponding to  $\text{M} = \text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$ . This 14 uma increment respect to parent TLZ ( $\text{MH}^+ = 381.1191$ ,  $\text{M} = \text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}$ ), matches with loss of 2 hydrogens and addition of 1 oxygen.

To ascertain TLZ-P structure,  $^1\text{H-NMR}$  experiments in  $\text{CD}_3\text{OD}$  were performed. Thus, a comparison between TLZ-P and TLZ spectra (Figs. S1a and S2, respectively) showed the following key features: i) the signals corresponding to  $\text{H}_a$  and  $\text{H}_b$  at  $\delta = 4.90$  ppm and  $\delta = 5.02$  ppm in TLZ are not present in the TLZ-P spectra, which is consistent with the formation of a double bond between  $\text{C}_a$  and  $\text{C}_b$ ; ii) the two doublet of doublets of  $\text{H}_c$  and  $\text{H}_d$  in TLZ ( $\delta = 6.95$  and  $\delta = 7.25$  ppm) disappear in TLZ-P spectrum; instead, only one doublet at  $\delta = 7.70$  ppm is observed. This is in agreement with the presence of a hydroxyl at  $\text{C}_c$  or  $\text{C}_d$ . From the couplings observed in bidimensional HSQC and HMBC experiments (Figure S1d and S1e), the proposed chemical structure of TLZ-P is that shown in Chart 1.



**Chart 1.** Chemical structure of talazoparib photoproduct, TLZ-P.

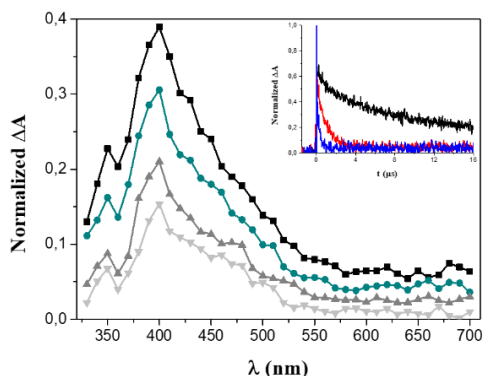
Bearing in mind that TLZ-P is a stable TLZ photoderivative that extends the absorption band to the visible region (see Fig. S3, for a comparison between TLZ and TLZ-P absorption spectra), an investigation of TLZ-P potential involvement in phototoxic issues is necessary in the context of photodamage produced by the parent drug.

### 3.2. Photophysical measurements

Normalized absorption and fluorescence spectra ( $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm) of TLZ in PBS are presented in Fig. S4. The energy of the first singlet excited state ( $E_S$ ), obtained from the intersection between both spectra, was found to be  $74 \text{ kcal mol}^{-1}$ . The TLZ fluorescence quantum yield ( $\phi_F$ ), was 0.12 in PBS and 0.10 in cells culture [29].

The normalized TLZ phosphorescence spectrum, performed at 77K in ethanol matrix, consisted in a band with  $\lambda_{\text{max}} = 512$  nm (Fig. S4). From the 30% of the rise of the band, the first triplet excited state energy ( $E_T$ ) was determined as  $61.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ [30]. The transient

absorption spectrum of TLZ (55  $\mu\text{M}$  in PBS,  $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\text{N}_2$ ) was obtained by laser flash photolysis. The band, with maximum at  $\lambda = 400 \text{ nm}$  (Fig. 3) was ascribed to the triplet excited state, based on the observed quenching by oxygen, characteristic of these species (Fig. 3 inset). The triplet lifetime ( $\tau_T$ ) value in  $\text{N}_2$  atmosphere was  $\tau_T = 8.8 \mu\text{s}$ . Experiments performed under oxygen, air and  $\text{N}_2$  allowed to obtain the oxygen quenching constant,  $k_{Tq}(\text{O}_2) = 3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .



**Fig. 3.** Laser flash photolysis of a 55  $\mu\text{M}$  TLZ solution in PBS at  $\lambda = 355 \text{ nm}$ . Transient absorption spectra at different time windows, under  $\text{N}_2$  atmosphere: 0.5  $\mu\text{s}$  (black), 2  $\mu\text{s}$  (dark cyan), 8  $\mu\text{s}$  (grey) and 12  $\mu\text{s}$  (fine grey). Inset: Decays monitored at  $\lambda = 400 \text{ nm}$  under nitrogen (black), air (red) and oxygen (blue) atmospheres.

The main photophysical properties of TLZ are summarized in Table 1. Unlike the parent drug, TLZ-P did not exhibit any fluorescence (Fig. S5) and no signals were detected in the LFP experiments. This suggests that the photoproduct could exhibit a photosafety profile. To investigate this hypothesis, *in vitro* neutral red uptake assay was also performed with the photoproduct.

**Table 1.** Main photophysical properties of TLZ.

$\lambda_{\text{max abs}} \text{ (nm)}^{\text{a}}$	250, 320, 350
$\lambda_{\text{max em}} \text{ (nm)}^{\text{b}}$	440
$E_s \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$	74.0
$\phi_{\text{F}}^{\text{b}}$	0.12
$\tau_{\text{F}} \text{ (ns)}^{\text{b}}$	< 1 ns
$\lambda_{\text{max em}} \text{ (nm)}^{\text{c}}$	512



$E_T$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	61.2
$\lambda_{\text{max abs}}$ (nm) <sup>d</sup>	400
$\tau_T$ ( $\mu$ s) <sup>d</sup>	8.8
$k_{Tq}(\text{O}_2)$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>d,e</sup>	$3.6 \times 10^9$

<sup>a</sup>absorption spectroscopy, 20  $\mu$ M, PBS, rt, air; <sup>b</sup>fluorescence spectroscopy,  $\lambda_{\text{exc}} = 305$  nm, 20  $\mu$ M, PBS, rt, air; <sup>c</sup>phosphorescence spectroscopy,  $\lambda_{\text{exc}} = 300$  nm, 50  $\mu$ M, ethanol, 77K, air; ; <sup>d</sup>transient absorption spectroscopy,  $\lambda_{\text{exc}} = 355$  nm, 55  $\mu$ M, PBS, rt, N<sub>2</sub>; <sup>e</sup> using Eq. 1.

### 3.3. *In vitro* phototoxicity assessments

#### 3.3.1. Neutral red uptake (NRU) assay

First, the TLZ and TLZ-P photoirritant factor (PIF) values were calculated from cell viability assays (through neutral red stain) of human keratinocytes (HaCaT) cells treated with increasing amounts of drug or photoproduct, under dark or UVA light conditions ( $\lambda = 350$ , light dose = 5 J/cm<sup>2</sup>). The PIF values of well-known positive (chlorpromazine, CPZ) and negative (sodium dodecyl sulfate, SDS) controls were also determined under the same conditions, to ensure the reliability of the results. According to the OECD 432 guideline (2019), a PIF lower than 2 means “no-phototoxicity”, a PIF between 2 and 5 indicates “probable phototoxicity” and PIF higher to 5 is associated to “phototoxicity”. See Materials and methods section for further experimental details.

From the corresponding dose-response curves (Fig. S6) for TLZ and TLZ-P at  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, their IC<sub>50</sub> values were determined. Results obtained for CPZ and SDS are presented in the same Fig. S6. The TLZ PIF value was found to be 7, with IC<sub>50</sub> dark > 500  $\mu$ M and IC<sub>50</sub> UVA light =  $76 \pm 14$   $\mu$ M. According to the above-mentioned OECD 432 guideline (2019) [21], the drug can be considered responsible to induce phototoxicity. However, for TLZ-P, both IC<sub>50</sub> dark and IC<sub>50</sub> UVA light resulted to be higher than 500  $\mu$ M, with a PIF value of *c.a.* 1. Since TLZ-P absorbs also light from the visible region (until 600 nm, see Fig. S3), its NRU assay was also performed at  $\lambda_{\text{exc}} = 520$  nm, using RB as positive control instead of CPZ that does not absorb at this wavelength. From the corresponding dose-response curves (Fig. S7) a PIF value of 1 was again obtained, indicating no phototoxicity.

**Table 2.** TLZ and TLZ-P *in vitro* HaCaT NRU phototoxicity assay.

Compound	IC <sub>50</sub> (dark)	IC <sub>50</sub> (light)	PIF
CPZ	94 ± 30	4 ± 1 <sup>a</sup>	24 <sup>c</sup>
SDS	168 ± 46	192 ± 53 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>
TLZ	> 500	76 ± 14 <sup>a</sup>	7 <sup>c</sup>
TLZ-P	> 500	> 500 <sup>a</sup>	1 <sup>c</sup>
RB	8 ± 3	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	20
SDS	150 ± 65	138 ± 50 <sup>b</sup>	1
TLZ-P	> 500	> 500 <sup>b</sup>	1

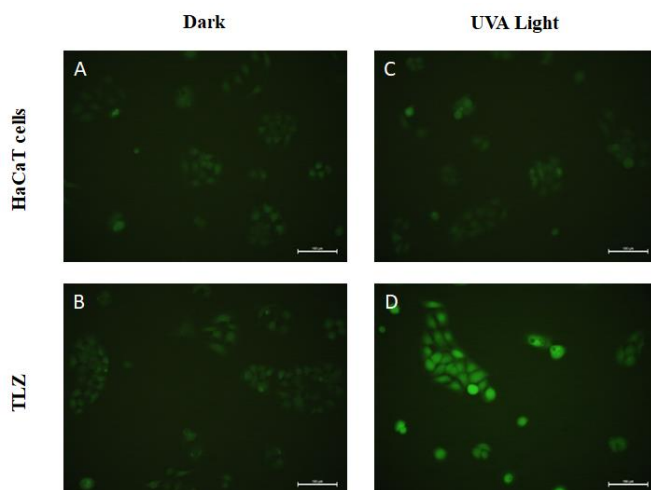
Data correspond to the mean ± SD from four experiments performed in triplicate. <sup>a</sup> $\lambda_{exc} = 350$  nm; <sup>b</sup> $\lambda_{exc} = 520$  nm; <sup>c</sup>In agreement with the OECD 432 guideline [21], PIF lower than 2 means “no phototoxicity”, PIF between 2-5 means “probably phototoxicity” and PIF higher than 5 means “phototoxicity”.

These results indicates that, although the parent drug is phototoxic under UVA radiation, its phototransformation leads to a derivative non-reactive towards UVA light. Moreover, from the experiments at  $\lambda = 520$  nm, it can be concluded that TLZ-P is not phototoxic either in the visible range. Hence, from now on, *in vitro* experiments were performed only for TLZ.

Since reactive oxygen species (ROS) formation is frequently at the origin of biomolecules and/or cell-membranes oxidation, next step was investigation of the possible TLZ-induced ROS generation under UVA irradiation.

### 3.3.2. Reactive oxygen species generation

For this purpose, HaCaT cells were seeded on 12-well plates and incubated in the presence of TLZ different concentrations (0, 85 and 100  $\mu$ M), either in the dark or under UVA irradiation (light dose = 5 J/cm<sup>2</sup>). Then, cells staining was performed using 25  $\mu$ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) and the emission of DCF was recorded by fluorescence microscopy, using a Fluorescein FITC filter. In Fig. 4, images A and B correspond to non-irradiated samples and images C and D are obtained after irradiation.



**Fig. 4.** ROS experiments for TLZ (100  $\mu\text{M}$ ): Representative photographs by fluorescence microscopy, using Fluorescein FITC as a filter. Human keratinocytes (HaCaT) cells were incubated in the absence (A, C) or presence (B, D) of TLZ, maintained in the dark (A, B) or irradiated (C, D) with UVA light (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). All samples were treated with 25  $\mu\text{M}$  2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ).

In the presence of TLZ (B) the fluorescence was almost negligible and similar to that recorded in the absence of drug (A), indicating no ROS formation. This is in agreement with the TLZ  $\text{IC}_{50}$  value obtained in the dark ( $> 500 \mu\text{M}$ ). By contrast, irradiated cells/TLZ mixtures exhibited fluorescence (D), pointing the ability of TLZ to generate ROS upon UVA radiation. The effect was dependent on drug concentration. As expected, the control experiment consisting in irradiation of cells in the absence of drug (C) did not give any positive result. More details are available in Fig. S8.

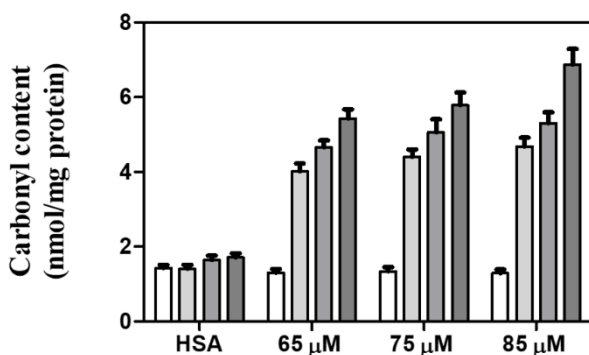
Next experiments were devoted to ascertain whether the TLZ observed phototoxicity could be attributed to proteins and/or genomic DNA.

### 3.3.3. Protein photooxidation evaluation

Given that TLZ binds efficiently to plasma proteins and that the most frequent (usually irreversible) oxidative modification to proteins is produced by carbonylation, the carbonyl content for TLZ/human serum albumin (HSA) systems was determined, as possible early

biomarker of oxidative damage. Thus, PBS solutions containing HSA (0.075  $\mu\text{M}$ ) and TLZ (65, 75 or 85  $\mu\text{M}$  in PBS) were irradiated with different UVA light doses (0, 5, 10 and 15  $\text{J}/\text{cm}^2$ ) and the carbonyl content measured using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization method.

Fig. 5 shows that the carbonyl content of TLZ/HSA systems increased significantly after UVA irradiation, which clearly evidences that TLZ induces photooxidation of cellular membranes. These results are in agreement with those initially obtained upon the NRU test. Another set of experiments with higher TLZ concentration (80, 120, 160  $\mu\text{M}$ ) is available in the Fig. S9.



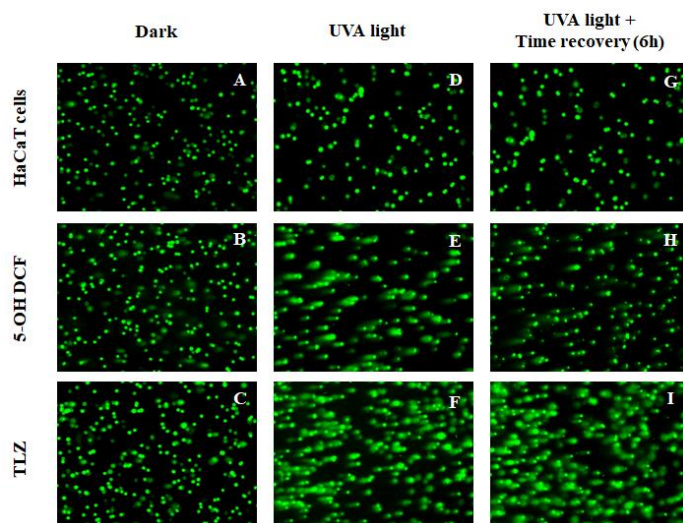
**Fig. 5.** Protein photooxidation by **TLZ**. The carbonyl content was determined using the DNPH derivatization method. Conditions: HSA: 0.075  $\mu\text{M}$ ; **TLZ**: 65, 75 or 85  $\mu\text{M}$ , irradiation doses (green scale): 0 ( $\square$ ), 5 ( $\blacksquare$ ), 10 ( $\blacksquare$ ) or 15 ( $\blacksquare$ )  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Data represent mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in triplicate.

#### 3.3.4. Photogenotoxicity by comet assay

To investigate the possibility of single-strand breaks (SSB), double-strand breaks (DSB) and alkali-labile sites formation on DNA of an individual cell [31], the comet assay under alkaline conditions was employed. To this end, HaCaT cells were incubated with TLZ 85  $\mu\text{M}$  for 30 min and irradiated with UVA light for 16 min (5  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). The resulting photolysate was embedded in agarose on a slide and alkaline electrophoresis was performed. This allowed migrating damaged and fragmented DNA away from the nucleus. After staining with SYBR Gold, the fluorescence of the comet nucleoids and tails was analyzed by fluorescence

microscopy, using the Fluorescein FITC filter. The DNA damage obtained was calculated by means of visual scoring of at least 100 DNA comets. Since cell death can promote in some extent DNA fragmentation by activation of caspase activated DNases (CADs), cell viability was also assessed by trypan blue exclusion assay [20], in order to avoid misleading results. Thus, viability rate was higher than 85 %, indicating the suitability of both UVA dose and drug concentration employed [32, 33]. A set of experiments was also performed using HaCaT cells in the absence of TLZ (negative control) or in the presence of 5-OH DCF 100  $\mu$ M (recovery positive control).

Comet results are shown in Fig. 6 and Fig. S10. They were performed on HaCaT cell alone (A, D, G), in the presence of 5-OH DCF (B, E, H) or TLZ (C, F, I); A, B, C correspond to non-irradiated samples, while D, E and F are obtained after irradiation and G, H, I are after irradiation and cell recovery. No differences were observed among the non-irradiated samples (A, B, C) indicating no damage, while TLZ in combination with UVA light (F) promotes significant damage to cells (*c.a.* 55%, Fig. S11), as seen when comparing with the negative (D) and positive (E) controls. It is noteworthy that, in comparison with the recovery positive control (H), no substantial reduction in nuclear DNA damage was noticed after 6 h of time recovery (I), indicating irreversible DNA damage.



**Fig. 6.** Representative fluorescence microscopy images (fluorescein FITC filter) of comet assay experiments. Human keratinocytes (HaCaT) cells were incubated alone (A, D, G), in

the presence of 5-OH DCF (B, E, H) and **TLZ** (C, F, I) in the dark (A, B, C), upon UVA irradiation (D, E, F) or upon UVA irradiation followed by 6 h recovery (G, H, I).

#### 4. Conclusions

Steady-state irradiations, photophysical experiments, and *in vitro* cellular and protein assays have been performed on the anticancer drug talazoparib (TLZ) to reveal if it is a photosafety drug. After UVA irradiation, TLZ photooxidizes to TLZ-P, a photoproduct that extends its absorption band to the visible region. The TLZ singlet and triplet excited states have been detected, while such transient species have not been observed for the photoproduct. This could be related with a higher phototoxicity of the parent drug than the photoproduct. In fact, from neutral red uptake assays the TLZ PIF value was 7 at  $\lambda_{exc} = 350$  nm, indicating phototoxicity, whereas PIF = 1 for TLZ-P when irradiating both at UVA and visible light. Besides, reactive oxygen species generation for TLZ/keratinocytes/UVA combination has been evidenced by recording the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein, and photooxidation of protein cellular membranes has been demonstrated by measuring the increase of carbonyl content of TLZ/HSA systems after UVA irradiation. Finally, irreversible DNA damage was found in the comet assays, indicating that TLZ could be also considered as photogenotoxic drug. The overall results indicates unambiguously that TLZ exhibits phototoxicity after UVA irradiation, which is relevant to advise photoprotection guidelines to patients if required and, thus, minimize the photosensitizing risk from the drug. In this connection, the findings obtained are highly relevant concerning TLZ photosafety, and it is clinically relevant to identify the cutaneous adverse reactions associated with targeted therapies. These findings will help dermatologists to improve clinical management in oncologic patients.

#### Funding Information

This research was supported by Agencia Estatal de Investigación (PID2020-115010RB-I00/AEI/10.13039/501100011033) and Generalitat Valenciana (CIAICO/2021/061 and ACIF/2018/153 fellowship for A. M.-P)

**Author contribution**

**Alejandro Mateos-Pujante:** Experimental work: photophysical measurements, *in vitro* experiments, preparative irradiations, spectroscopic characterization, Writing-editing; **M. Consuelo Jiménez:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis Writing – original draft, review & editing; **Inmaculada Andreu:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, review & editing.

**Declaration of competing interest**

There are not conflicts to declare.

**Data availability**

Data will be made available on request.

**Supplementary Information**

Supplementary data to this article can be found online at

**References**

1. Herceg Z, Wang Z-Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res.* 2001; 477: 97-110. doi: [10.1016/S0027-5107\(01\)00111-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00111-7).
2. Vyas S, Chesarone-Cataldo M, Todorova T et al. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat. Commun.* 2013; 4: 2240. doi: [10.1038/ncomms3240](https://doi.org/10.1038/ncomms3240).
3. Langelier M-F, Eisemann T, Riccio AA, Pascal JM. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018; 53: 187-198. doi: [10.1016/j.sbi.2018.11.002](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.11.002).
4. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017; 18: 610-621. doi: [10.1038/nrm.2017.53](https://doi.org/10.1038/nrm.2017.53).

5. Ménessier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* 2003; 22: 2255-2263. doi: [10.1093/emboj/cdg206](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg206).
6. Wang B, Chu D, Feng Y et al. Discovery and Characterization of (8S,9R)-5-Fluoro-8-(4-fluorophenyl)-9-(1-methyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-2,7,8,9-tetrahydro-3H-pyrido[4,3,2-de]phthalazin-3-one (BMN 673, Talazoparib), a Novel, Highly Potent, and Orally Efficacious Poly(ADP-ribose) Polymerase-1/2 Inhibitor, as an Anticancer Agent. *J. Med. Chem.* 2016; 59: 335-357. doi: [10.1021/acs.jmedchem.5b01498](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01498).
7. Cortesi L, Rugo HS, Jackisch C. An Overview of PARP Inhibitors for the Treatment of Breast Cancer. *Target. Oncol.* 2021; 16: 255-282. doi: [10.1007/s11523-021-00796-4](https://doi.org/10.1007/s11523-021-00796-4).
8. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* 2017; 355: 1152-1158. doi: [10.1126/science.aam7344](https://doi.org/10.1126/science.aam7344).
9. Michelena J, Lezaja A, Teloni F et al. Analysis of PARP inhibitor toxicity by multidimensional fluorescence microscopy reveals mechanisms of sensitivity and resistance. *Nat. Commun.* 2018; 9: 2678. doi: [10.1038/s41467-018-05031-9](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05031-9).
10. Hoy SM. Talazoparib: First Global Approval. *Drugs* 2018; 78: 1939-1946. doi: [10.1007/s40265-018-1026-z](https://doi.org/10.1007/s40265-018-1026-z).
11. Litton JK, Rugo HS, Ettl J et al. Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379: 753-763. doi: [10.1056/NEJMoa1802905](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1802905).
12. Hurvitz SA, Gonçalves A, Rugo HS et al. Talazoparib in Patients with a Germline BRCA-Mutated Advanced Breast Cancer: Detailed Safety Analyses from the Phase III EMBRACA Trial. *Oncologist* 2020; 25: e439-e450. doi: [10.1634/theoncologist.2019-0493](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0493).
13. Guney Eskiler G, Yanar S, Akpınar G, Kasap M. Proteomic analysis of talazoparib resistance in triple-negative breast cancer cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2021; 35: e22678. doi: [10.1002/jbt.22678](https://doi.org/10.1002/jbt.22678).
14. Yu Y, Chung CH, Plotka A et al. A Phase 1 Mass Balance Study of (14) C-Labeled Talazoparib in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Pharmacol.* 2019; 59: 1195-1203. doi: [10.1002/jcph.1415](https://doi.org/10.1002/jcph.1415).



15. Boussios S, Abson C, Moschetta M et al. Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors: Talazoparib in Ovarian Cancer and Beyond. *Drugs R D*. 2020; 20: 55-73. doi: [10.1007/s40268-020-00301-8](https://doi.org/10.1007/s40268-020-00301-8).
16. de Bono JS, Mehra N, Scagliotti GV et al. Talazoparib monotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair alterations (TALAPRO-1): an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22: 1250-1264. doi: [10.1016/s1470-2045\(21\)00376-4](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00376-4).
17. Lesueur P, Chevalier F, El-Habr EA et al. Radiosensitization Effect of Talazoparib, a Parp Inhibitor, on Glioblastoma Stem Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Sci. Rep*. 2018; 8: 3664. doi: [10.1038/s41598-018-22022-4](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22022-4).
18. Baldwin P, Ohman AW, Medina JE et al. Nanof ormulation of Talazoparib Delays Tumor Progression and Ascites Formation in a Late Stage Cancer Model. *Front. Oncol*. 2019; 9: 353. doi: [10.3389/fonc.2019.00353](https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00353).
19. Mateos-Pujante A, Jiménez MC, Andreu I. Evaluation of phototoxicity induced by the anticancer drug rucaparib. *Sci. Rep*. 2022; 12: 3434. doi: [10.1038/s41598-022-07319-9](https://doi.org/10.1038/s41598-022-07319-9).
20. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111: A3.B.1-a3.B.3. doi: [10.1002/0471142735.ima03bs111](https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111).
21. OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. 2019. doi: [10.1787/9789264071162-en](https://doi.org/10.1787/9789264071162-en).
22. Svobodová AR, Ultichová J, Vostálová J. Human keratinocyte cell line as a suitable model for in vitro phototoxicity testing. *An. Bras. Dermatol*. 2019; 94: 105-106. doi: [10.1590/abd1806-4841.20197620](https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20197620).
23. Srivastav AK, Mujtaba SF, Dwivedi A et al. Photosensitized rose Bengal-induced phototoxicity on human melanoma cell line under natural sunlight exposure. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol*. 2016; 156: 87-99. doi: [10.1016/j.jphotobiol.2015.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.12.001).
24. Wang X, Roper MG. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal. Methods* 2014; 6: 3019-3024. doi: [10.1039/c4ay00288a](https://doi.org/10.1039/c4ay00288a).
25. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B*. 2016; 1019: 178-190. doi: [10.1016/j.jchromb.2015.11.052](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052).

26. Palumbo F, Garcia-Lainez G, Limones-Herrero D et al. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016; 313: 131-137. doi: [10.1016/j.taap.2016.10.024](https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.024).
27. Møller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res.* 2006; 612: 84-104. doi: [10.1016/j.mrrev.2005.10.001](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2005.10.001).
28. Garcia-Lainez G, Martínez-Reig AM, Limones-Herrero D et al. Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2018; 341: 51-55. doi: [10.1016/j.taap.2018.01.005](https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.005).
29. Melhuish WH. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J. Phys. Chem.* 1961; 65: 229-235. doi: [10.1021/j100820a009](https://doi.org/10.1021/j100820a009).
30. Marco Montalti AC, Luca Prodi, M. Teresa Gandolfi. *Handbook of Photochemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2006.
31. Collins AR. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol. Biol.* 2002; 203: 163-177. doi: [10.1385/1-59259-179-5:163](https://doi.org/10.1385/1-59259-179-5:163).
32. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* 2013; 87: 949-968. doi: [10.1007/s00204-013-1070-0](https://doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0).
33. Gleis M, Schneider T, Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. *Arch. Toxicol.* 2016; 90: 2315-2336. doi: [10.1007/s00204-016-1767-y](https://doi.org/10.1007/s00204-016-1767-y).