

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Predicción de la sensibilización cutánea por palbociclib y paclitaxel mediante las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox.

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Trabajo Fin de Grado

Autor/a: Andrea Monzó Mayans

Tutor académico: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

Cotutores externos: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Inés Roger Laparra

Curso Académico: 2019/2020

Valencia, Junio de 2020

Título: Predicción de la sensibilización cutánea por palbociclib y paclitaxel mediante las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox.

Resumen:

Durante los últimos años se han desarrollado muchos fármacos para el tratamiento del cáncer más común y con mayor mortalidad entre las mujeres, el cáncer de mama. Entre estos se encuentran palbociclib, el cual es un inhibidor de la CDK4/6 y paclitaxel, un antineoplásico antimetabólico. Sin embargo, el tratamiento con antineoplásicos puede venir acompañado de distintos efectos secundarios entre los que se encuentra la sensibilización cutánea que es la consecuencia de una respuesta alérgica inducida por la exposición de la piel a un compuesto químico sensibilizante, pudiendo alterar así el curso del tratamiento antitumoral e implicar una disminución en la calidad de vida del paciente. Es por esto que se precisa conocer de forma previa la capacidad de un antineoplásico para desencadenar reacciones de sensibilización cutánea.

Para poder desarrollar técnicas de predicción de sensibilización cutánea por un compuesto químico, con el conocimiento existente se ha construido un marco conceptual llamado *Adverse outcome pathway* (AOP), que recoge el mecanismo de sensibilización cutánea en dos fases. Primero se presenta una fase de inducción (sensibilización) con cuatro eventos clave consecutivos: un primer evento clave de unión del compuesto químico covalentemente a una proteína endógena de la piel, un segundo evento clave de activación de queratinocitos, un tercer evento clave de activación de células dendríticas y finalmente un cuarto evento clave de producción de linfocitos T específicos del alérgeno. La segunda fase es la de activación en la que se produce la subsecuente reacción inmune cuando el individuo se reexpone al agente sensibilizante.

Así, se han desarrollado técnicas alternativas al uso de animales que evalúan los eventos clave de la sensibilización. La técnica *in chemico* de Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA) analiza la capacidad del compuesto químico de desencadenar el primer evento clave de unión covalente a proteínas endógenas de la piel, la técnica *in vitro* Keratinosens analiza la capacidad de desencadenar el segundo evento clave de activación de queratinocitos y la técnica *in vitro* de Ensayo de Activación de la línea celular humana (h-CLAT) analiza la capacidad de producir el tercer evento clave de activación de células dendríticas. Además, también se ha creado la técnica *in silico* QSAR Toolbox, un software capaz de predecir si un compuesto químico es sensibilizante cutáneo a partir de su estructura. De este modo, el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de los antineoplásicos palbociclib y paclitaxel de desencadenar una reacción de sensibilización cutánea empleando las técnicas de DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox y determinar si dichas técnicas constituyen un buen modelo predictivo para testar futuros antineoplásicos.

Palabras clave: Sensibilización cutánea, antineoplásico, DPRA, Keratinosens, h-CLAT, QSAR Toolbox.

Autor/a: Andrea Monzó Mayans

Tutor Académico: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

Cotutores externos: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña Inés Roger Laparra

Valencia, Junio de 2020

Title: Prediction of skin sensitisation by palbociclib and paclitaxel using the DPRA, Keratinosens, h-CLAT and QSAR Toolbox techniques.

Abstract:

Over the past few years, many drugs have been developed to treat the most common and most fatal cancer among women, breast cancer. These include palbociclib, which is a CDK4/6 inhibitor, and paclitaxel, an antimitotic antineoplastic. However, antineoplastic treatment can be accompanied by different side effects, among which we find skin sensitisation, which is the consequence of an allergic response induced by skin exposure to a sensitising chemical compound, thus altering the course of the treatment and involving a decrease in the quality of life of the patient. This is why it is necessary to previously know the ability of an antineoplastic to trigger skin sensitisation reactions.

In order to develop techniques for predicting cutaneous sensitisation by a chemical compound, with the existing knowledge, a conceptual framework called Adverse outcome pathway (AOP) has been constructed and this includes the cutaneous sensitisation mechanism in two phases. An induction (sensitisation) phase with four consecutive key events: a first key event of covalent binding of the chemical compound to an endogenous skin protein, a second key event of keratinocytes activation, a third key event of dendritic cells activation and finally, a fourth key event of allergen-specific T lymphocyte production. The second phase is the activation phase in which the subsequent immune reaction occurs when the individual is re-exposed to the sensitising agent.

Thus, alternative techniques to the use of animals that evaluate the key events of sensitisation have been developed. The *in chemico* technique of Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) analyzes the ability of the chemical compound to trigger the first key event of covalent binding to endogenous skin proteins, the *in vitro* Keratinosens technique analyzes the ability to trigger the second key event of keratinocytes activation and the *in vitro* human Cell Line Activation Test (h-CLAT) analyzes the ability to produce the third key event of dendritic cells activation. In addition, the *in silico* QSAR Toolbox technique has also been created, this is a software capable of predicting whether a chemical compound is a skin sensitizer based on its structure. In this way, the objective of this study is to evaluate the ability of the antineoplastic drugs palbociclib and paclitaxel to trigger a skin sensitisation reaction using the techniques of DPRA, Keratinosens, h-CLAT and QSAR Toolbox and to determine if these techniques constitute a proper predictive model to test future antineoplastics.

Key words: Skin sensitisation, antineoplastic, DPRA, Keratinosens, h-CLAT, QSAR Toolbox.

Author: Andrea Monzó Mayans

Academic tutor: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

External cotutors: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña Inés Roger Laparra

Valencia, June 2020

Agradecimientos

En primer lloc, agrair als meus tutors haver fet possible la realització d'aquest treball que marca una etapa tan important per a mi. També vull agrair a les grans científiques del laboratori tota l'ajuda prestada i haver-me introduït en el món de la investigació d'una forma tan acollidora i amena, especialment a Inés, per tota la paciència i dedicació que ha tingut. Finalment, gràcies a tota la meua família per confiar sempre en mi i donar-me suport per a seguir en el meu camí.

Índice general

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÁNCER DE MAMA.....	1
1.1.1. Epidemiología y definición.....	1
1.1.2. Factores de riesgo.....	1
1.1.3. Clasificación y biomarcadores.....	1
1.1.4. Tratamiento.....	2
1.2. ANTINEOPLÁSICOS A TESTAR.....	4
1.2.1. Palbociclib.....	4
1.2.2. Paclitaxel.....	7
1.3. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA.....	9
1.4. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN.....	11
1.4.1. Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA).....	12
1.4.2. Keratinosens.....	13
1.4.3. Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT).....	15
1.4.4. Herramienta QSAR Toolbox.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. MATERIALES.....	18
3.2. MÉTODOS.....	19
3.2.1. Cultivo celular.....	19
3.2.1.1. <i>Keratinosens</i>	19
3.2.1.2. <i>THP-1</i>	19
3.2.2. Técnicas.....	19
3.2.2.1. <i>DPRA</i>	19
3.2.2.2. <i>Keratinosens</i>	20
3.2.2.3. <i>h-CLAT</i>	22
3.2.2.4. <i>QSAR Toolbox</i>	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	23
4.1. PALBOCICLIB.....	23
4.1.1. Resultados de la técnica DPRA.....	23
4.1.2. Resultados de la técnica Keratinosens.....	24
4.1.3. Resultados de la técnica h-CLAT.....	25
4.1.4. Resultados de QSAR Toolbox.....	26
4.2. PACLITAXEL.....	27
4.2.1. Resultados de la técnica DPRA.....	27
4.2.2. Resultados de la técnica Keratinosens.....	28
4.2.3. Resultados de la técnica h-CLAT.....	29
4.2.4. Resultados de QSAR Toolbox.....	30
5. CONCLUSIONES.....	32
6. REFERENCIAS.....	33

Índice de figuras

FIGURA 1. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS DE TEJIDO MAMARIO.....	2
FIGURA 2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA.....	5
FIGURA 3. PRINCIPALES RUTAS INHIBIDAS POR PALBOCICLIB.....	6
FIGURA 4. PRINCIPALES MECANISMOS DE ACCIÓN DE PACLITAXEL.....	8
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA FASE DE INDUCCIÓN DE LA SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA...11	
FIGURA 6. MECANISMO MOLECULAR UTILIZADO EN KERATINOSENS.....	14
FIGURA 7. ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA THP-1 POR UN COMPUESTO QUÍMICO SENSIBILIZANTE.....	15
FIGURA 8. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PALBOCICLIB POR EL ENSAYO DIRECTO DE REACTIVIDAD PEPTÍDICA (DPRA).....	23
FIGURA 9. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PALBOCICLIB POR LA TÉCNICA KERATINOSENS.....	24
FIGURA 10. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PALBOCICLIB POR EL TEST DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA (h-CLAT).....	25
FIGURA 11. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PALBOCICLIB POR LA HERRAMIENTA QSAR TOOLBOX DE LA OECD.....	26
FIGURA 12 ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PACLITAXEL POR EL ENSAYO DIRECTO DE REACTIVIDAD PEPTÍDICA (DPRA).....	27
FIGURA 13. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PACLITAXEL POR LA TÉCNICA KERATINOSENS.....	29
FIGURA 14. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PACLITAXEL POR EL TEST DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA (h-CLAT).....	30
FIGURA 15. ANÁLISIS DEL POTENCIAL SENSIBILIZANTE DE PACLITAXEL POR LA HERRAMIENTA QSAR TOOLBOX DE LA OECD.....	31

Índice de tablas

TABLA 1. MODELO DE PREDICCIÓN DEL ENSAYO DIRECTO DE REACTIVIDAD PEPTÍDICA (DPRA)
CON SOLO CISTEÍNA.....13

TABLA 2. REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS JUNTO CON SUS REFERENCIAS.....18

TABLA 3. MEDIA DE LOS VALORES EC1.5, IC₃₀ E IC₅₀ PARA EL COMPUESTO PACLITAXEL.....29

Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- *AKR1C2*: Aldo-keto reductase family 1 member C2
- AOP: Adverse Outcome Pathway
- ARE/EpRE: Elementos de respuesta antioxidante/ Elementos de respuesta a electrófilos
- Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*
- BRCA1: Gen *Breast cancer 1*
- BRCA2: Gen *Breast cancer 2*
- CCL19: Ligando de quimiocina 19 (motivo CC)
- CCL21: Ligando de quimiocina 21 (motivo CC)
- CDI: Carcinoma ductal invasivo
- CDIS: Carcinoma ductal in situ
- CDK4/6: Quinasa dependiente de ciclina 4/6
- CLI: Carcinoma lobulillar invasivo
- CLIS: Carcinoma lobulillar in situ
- CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- DNCB: 2,4-dinitroclorobenceno
- DNMT1: ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1
- DPBS: *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
- DPRA: Ensayo de Reactividad Peptídica Directo
- EC1.5 = Concentración a la cual la inducción de la actividad de la luciferasa es igual a 1.5
- ECVAM: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos
- ERE: Elementos de respuesta a estrógeno
- ERK: Quinasa regulada por señal externa
- ERV: Retrovirus endógeno
- FBS: *Fetal bovine serum*
- FCS: *Fetal Calf Serum*
- FDA: Administración de Medicamentos y Alimentación
- FITC: Isotiocianato de fluoresceína
- FOXM1: Forkhead Box M1
- GDP: Guanosín difosfato
- GPMT: Prueba de Maximización del Conejillo de Indias
- GSHST: Glutación S-transferasa
- GTP: Guanosín trifosfato
- h-CLAT: Test de Activación de la Línea Celular humana
- HaCaT: Línea celular de queratinocitos inmortales
- HER2: Receptor del factor crecimiento epidérmico humano 2
- HMGCR: 3-hidroxi-metil-glutaril-CoA reductasa
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- IC₃₀ = Concentración mínima necesaria para provocar una disminución en la viabilidad celular del 30%
- IC₅₀ = Concentración mínima necesaria para provocar una disminución en la viabilidad celular del 50%
- IFR: Intensidad de fluorescencia relativa
- IL-18: Interleucina 18
- I_{max} : Inducción de la actividad luciferasa máxima global
- Keap1: *Kelch-like ECH-associated protein 1*
- LLNA: Ensayo del Ganglio Linfático Local
- Log Kow: Coeficiente de reparto octanol-agua

- MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
- MFI: Media geométrica de la intensidad de fluorescencia
- MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NQO1: NADPH-quinona oxidoreductasa 1
- Nrf2: *Nuclear erythroid 2-related factor 2*
- OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
- p38 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos p38
- PFK1: 6-fosfofructoquinasa
- pH: Potencial de hidrógeno
- pKa: Media logarítmica de la constante de acidez
- PKM2: Piruvato quinasa M2
- QSAR: *Quantitative structure-activity relationship*
- Rb: Proteína del retinoblastoma
- RE: Receptor de estrógenos
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- RP: Receptor de progesterona
- RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute
- SD: Desviación estándar
- SMILES: *Simplified Molecular Input Line Specification*
- THP-1: Línea celular de leucemia monocítica aguda
- TLR4: Receptor tipo Toll 4

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE MAMA

1.1.1. Epidemiología y definición

Actualmente, el cáncer es la primera causa de muerte en los países industrializados (Dagenais *et al.*, 2020). Concretamente, el cáncer de mama es el cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres y con mayor mortalidad entre el sexo femenino, según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2020). Su incidencia ha ido aumentando con el paso del tiempo en todo el mundo, estimándose un número de 2.088.849 casos nuevos en el año 2018 (GLOBOCAN, 2018). Sin embargo, gracias a la investigación, la tasa de mortalidad se ha visto reducida globalmente a lo largo de los años (Hendrik *et al.*, 2019).

El cáncer de seno se da cuando las células que componen el tejido mamario sufren alteraciones genéticas y adquieren los denominados *hallmarks* del cáncer que incluyen: autonomía en las señales de crecimiento, evasión de las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la apoptosis, inestabilidad genómica y mutagénesis, replicación ilimitada, invasión y metástasis, entre otros (Hanahan y Weingberg, 2000). De este modo, se da un crecimiento incontrolado de las células mamarias, pudiéndose diseminar a otros tejidos del organismo.

1.1.2. Factores de riesgo

Entre los principales factores de riesgo de esta neoplasia se encuentran los factores demográficos como el sexo, ya que es una enfermedad que afecta principalmente a mujeres aunque en un bajo porcentaje también pueden padecerla los hombres, y la edad, ya que la incidencia de este cáncer aumenta con la edad manifestándose principalmente en la época de la menopausia. Entre los factores reproductivos, la edad temprana de menarquia, menopausia tardía o nuliparidad aumentan las probabilidades de padecer esta enfermedad. También factores hormonales como la píldora anticonceptiva o factores relacionados con el estilo de vida como la obesidad, consumo de alcohol y tabaquismo son riesgos asociados al cáncer de mama. Además, esta es una enfermedad hereditaria, por lo que el tener antecedentes familiares de cáncer de mama eleva de forma significativa las probabilidades de sufrir esta patología. Entre los principales genes de susceptibilidad al cáncer de mama identificados se encuentran los genes *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) y *BRCA2* (*Breast Cancer 2*) cuyas proteínas están implicadas en la reparación homóloga del ADN, así, las mutaciones en estos genes confieren un riesgo elevado de carcinoma de mama y son heredadas de forma autosómica dominante (Da silva y Lakhani, 2010; Momenimovahed y Salehiniya, 2019).

1.1.3. Clasificación y biomarcadores

Este tipo de cáncer es complejo y heterogéneo por lo que está sujeto a múltiples clasificaciones, sin embargo, la principal clasificación es según su histopatología. El cáncer de mama puede desarrollarse a partir de cualquier célula de la glándula mamaria, así, el cáncer derivado del epitelio del revestimiento interno de los conductos se denomina carcinoma ductal y el cáncer derivado del lóbulo se denomina carcinoma lobulillar. A su vez, dependiendo de si el carcinoma está limitado al componente epitelial de la mama o si ha invadido el estroma, se clasifica en carcinoma *in situ* o invasivo, respectivamente. De este modo, se encuentran el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS), carcinoma ductal *in situ* (CDIS), carcinoma lobulillar invasivo (CLI) y carcinoma ductal invasivo (CDI), siendo este último el tipo más común (Makki, 2015).

El análisis de biomarcadores en las células cancerosas es un aspecto indispensable para poder determinar el comportamiento biológico de las células del tumor y así poder seleccionar la terapia óptima para cada paciente. De este modo, evaluando los marcadores moleculares se han establecido diferentes subtipos de cáncer de mama. Los marcadores establecidos actualmente son el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y el marcador de proliferación Ki67 (Figura 1).

El RE es el marcador más habitual, se encuentra expresado en el 80% de los casos y las células utilizan la hormona esteroide estradiol como estímulo para su crecimiento. El RP depende de la presencia del RE, y en menos del 1% de los casos aparece expresado en ausencia de receptor de estrógenos. El HER2, se encuentra sobreexpresado o su gen *HER2* amplificado en el 15-30% de los casos y está asociado a mayor agresividad, una mayor probabilidad de recurrencia del cáncer y una menor supervivencia (Iqbal y Iqbal, 2014; Weigel y Dowsett, 2010). Finalmente, el marcador Ki67 tiene una expresión máxima durante la mitosis celular e indica la actividad proliferativa del tumor (Dai *et al.*, 2016).

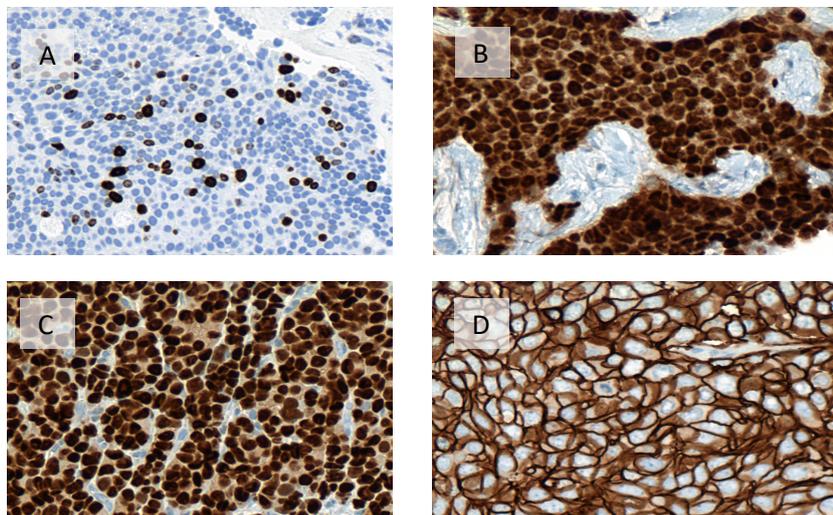


Figura 1. Tinciones inmunohistoquímicas de tejido mamario. (A) Tinción inmunohistoquímica donde el marcaje marrón indica la expresión de Ki67. (B) Tinción inmunohistoquímica donde el marcaje marrón indica la expresión del receptor de progesterona. (C) Tinción inmunohistoquímica donde el marcaje marrón indica la expresión del receptor de estrógenos. (D) Tinción inmunohistoquímica donde el marcaje marrón indica la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) (Obtenido de Roger, 2014).

Así pues, según la combinación de dichos marcadores, se han establecido cuatro subtipos principales de cáncer de mama: luminal tipo A (positivos para RE y/o RP y negativos para HER2 con Ki67 bajo), luminal tipo B (positivo para RE y/o RP con Ki67 alto o RE y/o RP positivo y HER2 positivo), HER2 positivos (negativos para RE y RP y positivos para HER2), o triple negativo (negativos tanto para RE, RP y HER2) (Fragomeni *et al.*, 2018).

1.1.4. Tratamientos

Dependiendo de las características que se presenten, se seleccionará para el paciente un tipo de tratamiento específico. Existen terapias locorregionales y terapias sistémicas.

Entre las terapias locorregionales se encuentran los tratamientos quirúrgicos como la mastectomía, la cual se ha ido sustituyendo por cirugías oncológicas realizando normalmente

un tratamiento sistémico previo para reducir el tamaño del tumor, o la radioterapia que suele aplicarse después de la cirugía para la eliminación de las células tumorales residuales o para inducir un efecto abscopal. Generalmente este tipo de terapias se enfocan en el tratamiento de cáncer de mama temprano (Harbeck *et al.*, 2019).

Respecto a las terapias sistémicas, entre estas se encuentran la terapia dirigida, terapia hormonal y la quimioterapia, que pueden ser aplicadas antes (neoadyuvante) o después de la cirugía (adyuvante).

En la terapia dirigida, se utilizan fármacos que se dirigen de forma precisa a las células cancerosas que presentan receptores específicos, evitando la destrucción de las células no tumorales. La terapia dirigida más eficiente actualmente es la terapia dirigida al receptor HER2 mediante fármacos como trastuzumab o pertuzumab que se unen a los dominios extracelulares de este receptor inhibiendo su función (Oh y Bang, 2020).

La terapia endocrina, considerada un tipo de terapia dirigida, se centra en los carcinomas que presentan los biomarcadores hormonales, y entre los más empleados están, el tamoxifeno el cual es un fármaco que bloquea los RE del tejido de mama reduciendo los efectos inducidos por dicha hormona y los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima implicada en la síntesis de estrógenos, evitando su generación y que se unan a su receptor (Harbeck y Gnant, 2017; Shagufta y Ahmad, 2018; Smith y Dowsett, 2003).

Finalmente, la quimioterapia que emplea agentes químicos, normalmente combinados, para intervenir en la proliferación celular sin especificidad, sigue siendo a día de hoy el estándar en el tratamiento del cáncer, a pesar del impacto negativo que puede tener en las células sanas del organismo. Entre los quimioterapéuticos más utilizados en el cáncer de mama, se encuentran las antraciclina que principalmente intervienen con la función de la topoisomerasa II del ADN generando roturas en el ADN y conduciendo a apoptosis celular (Beretta y Zunino, 2008) o el paclitaxel, antineoplásico que detiene las células en división por su unión a los microtúbulos (Zasadil *et al.*, 2014).

En los últimos años se han puesto numerosos esfuerzos en la mejora y desarrollo de fármacos que sean más efectivos, más específicos y que mejoren el pronóstico del paciente. Sin embargo, un aspecto que a día de hoy es difícilmente controlable y prácticamente inevitable son los efectos indeseados, los denominados efectos secundarios, que puede desencadenar un fármaco administrado sistemáticamente por el organismo humano.

Los fármacos anticancerígenos, sobre todo los quimioterapéuticos, tienen la capacidad de causar reacciones de hipersensibilidad y entre estas se encuentra la sensibilización cutánea. Aunque la alteración cutánea se trata de una complicación secundaria cuyo mecanismo no se comprende en su totalidad, es un efecto colateral frecuente y temprano que reduce la calidad de vida de los pacientes y puede alterar el transcurso del tratamiento. Entre los síntomas dermatológicos se incluyen el prurito, urticaria, sarpullidos, eritema palmar y el angioedema (Cortijo-cascajares *et al.*, 2012).

Así pues, dado que el cuidado del paciente oncológico precisa de una comprensión integral de las posibles reacciones secundarias que puedan surgir durante su tratamiento, es importante poder analizar de forma previa la capacidad de desencadenar sensibilización cutánea que pueden presentar los antineoplásicos.

1.2. ANTINEOPLÁSICOS A TESTAR.

1.2.1. Palbociclib

El antineoplásico palbociclib fue autorizado en Europa en noviembre de 2016, convirtiéndose en el primer inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas 4/6 (CDK4/6) aprobado en Europa (PFIZER, 2016). Este fármaco está indicado para el tratamiento de cáncer de mama RE positivo HER2 negativo y su forma farmacéutica es de cápsula dura, por lo que se administra de forma oral (EMA, 2018).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los estrógenos, estos difunden por la membrana plasmática y son recibidos dentro de la célula por el receptor de estrógenos, concretamente por el RE alfa que es el que está principalmente involucrado en el carcinoma mamario (Madeira *et al.*, 2013). Así, RE alfa que consta de un dominio de unión al ADN y un dominio de unión al ligando, al unirse con el estrógeno en el citoplasma, cambia su conformación, dimeriza y queda activado, de este modo se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción uniéndose a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) del ADN próximos a los genes objetivo, regulándolos positiva o negativamente. El RE activado también puede tener una acción genómica indirecta a través de la interacción con otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (Manavathi *et al.*, 2013). Además, el RE ubicado en la cara interna de la membrana plasmática puede actuar mediante una vía no genómica en la que activa distintas vías de transducción de señales citoplasmáticas, como las vías de MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) importantes en la progresión y desarrollo del cáncer (Acconcia *et al.*, 2005).

Una característica común para el desarrollo del cáncer es la pérdida de control del ciclo celular y se ha observado que un objetivo de la señalización de estrógenos es la sobreexpresión de la Ciclina D1 que conduce al desarrollo del carcinoma mediante la desregulación de la vía del supresor tumoral del Retinoblastoma (Rb) (Ahlin *et al.*, 2017). Cabe señalar que el promotor de la Ciclina D1 no consta de elementos ERE por lo que el RE regula su expresión a través del reclutamiento de otros factores de transcripción (Sabbah *et al.*, 1999).

Durante el ciclo celular, en la fase G1 se presenta un punto clave de control, el punto de restricción, para determinar si la célula avanza a la fase S adquiriendo un fenotipo más proliferativo, o si diverge a la fase de senescencia G0. Para la progresión de la célula de la fase G1 a S se requiere que las ciclinas se unan a la CDK4 o a su homóloga CDK6 y que este complejo fosforee la proteína del Retinoblastoma (Rb). De este modo, Rb fosforilada es incapaz de inhibir a los factores transcripcionales de la familia E2F y así estos factores de transcripción pueden ejercer su función de promover la expresión de los genes necesarios para la replicación del ADN en la fase S (Murphy y Dickler, 2015). De este modo, la sobreexpresión de la ciclina D1 conlleva a una estimulación de esta ruta, sobreactivando las CDK4/6 provocando una proliferación descontrolada de las células (Figura 2).

El fármaco palbociclib se desarrolló a partir de compuestos de piridopirimidina y posee una alta selectividad por CDK4 y CDK6. Su mecanismo de acción está basado principalmente en inhibir específicamente las CDK4/6 para que la proteína Rb quede hipofosforilada y pueda ejercer su acción sobre el factor transcripcional E2F, derivando a las células con una alta proliferación al estado G0 de senescencia.

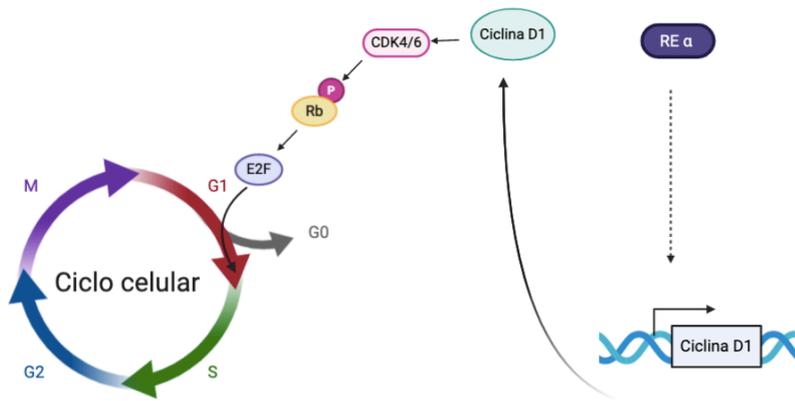


Figura 2. Mecanismo de acción del receptor de estrógenos alfa. El receptor de estrógenos alfa (RE alfa) promueve la expresión de la ciclina D1 que interacciona con las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6) las cuales fosforilan (P) y bloquean la proteína del retinoblastoma (Rb). Así, el factor de transcripción E2F está libre y promueve la expresión de genes necesarios en la fase S, promoviendo la proliferación celular .

Sin embargo, palbociclib también actúa en otras vías de las CDK4/6, como se indica en la Figura 3. Por un lado, promueve la apoptosis celular desencadenada por especies reactivas de oxígeno (ROS) inhibiendo la CDK6. Se ha descubierto que en las células tumorales el complejo de CDK6 junto a la Ciclina 3 interviene en el metabolismo celular, fosforila e inhibe dos enzimas clave de la vía glucolítica, la 6-fosfofructoquinasa (PFK1) y la piruvato quinasa M2 (PKM2) lo que conduce a la síntesis de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) y glutatión que son claves en el mecanismo de defensa de ROS. De este modo, palbociclib al inhibir la CDK6 conllevaría a la restricción en la producción de NADPH y glutatión promoviendo la apoptosis celular desencadenada por ROS (Wang *et al.*, 2017). También se ha observado que CDK4/6 activados tienen como objetivo la estabilización y activación mediante fosforilación de la proteína FOXM1 (Forkhead Box M1) cuya función es mantener la expresión de los genes que impulsan la división celular, suprimir la entrada en la senescencia y eliminar los niveles de ROS. Así pues, palbociclib al inhibir CDK4/6 impide la ejecución de estos mecanismos proliferativos y de protección (Anders *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2017).

Además, un estudio demuestra que la inhibición de las CDK4/6 estimula la inmunidad antitumoral (Goel *et al.*, 2017). Como se ha mencionado anteriormente, al inhibir CDK4/6, se obstaculiza la función de E2F y un objetivo de éste es el gen de la ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 (DNMT1), por consiguiente, los genes retrovirales endógenos (ERVs) quedan hipometilados y se expresan, desencadenando una mímica viral. De este modo se estimula la producción de interferón tipo III en las células tumorales que de forma autocrina promueve la expresión de los productos de genes estimulados por interferón implicados en la adhesión y coestimulación de linfocitos, mejorando su capacidad de presentación antigénica (Goel *et al.*, 2017). De forma adicional, también se observó que la inhibición de CDK4/6 suprimía selectivamente la proliferación de linfocitos inmunosupresores, es decir, los linfocitos T reguladores, posiblemente porque presentan mayor expresión de Rb que los demás linfocitos (Goel *et al.*, 2017; Heng *et al.*, 2008).

Palbociclib también ha demostrado tener actividades independientes a CDK4/6. En el estudio llevado a cabo por Miettien *et al.* (2018) se reveló que palbociclib tenía un impacto sobre la actividad del proteasoma 26S. De este modo, palbociclib interactuaba con la proteína Ecm29 que en condiciones normales actúa como represor del proteasoma (Finley *et al.*, 2016), y así de forma indirecta conducía a una hiperactivación de la actividad proteasómica que se asoció con la degradación de proteínas implicadas en la proliferación endógena, entre ellas HMGC (3-

hidroxi-metil-glutaril-CoA reductasa) y CDK4, reduciendo la proliferación de las células cancerosas e induciendo un fenotipo de senescencia.

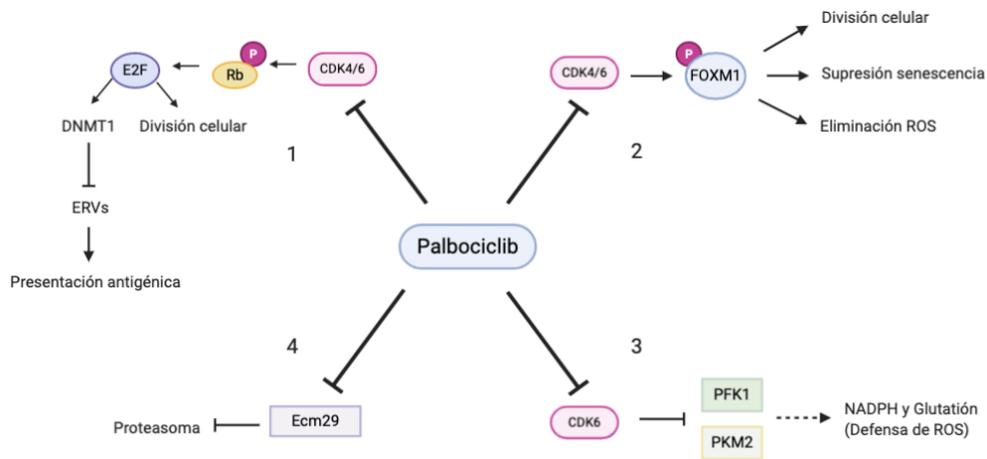


Figura 3. Principales rutas inhibidas por palbociclib. (1) En condiciones normales, las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4/6) activas fosforilan (P) la proteína del retinoblastoma (Rb), el factor de transcripción E2F libre promueve la división celular y la expresión de la proteína ADN (citosina-5)-metiltransferasa 1 (DNMT1) la cual inhibe la expresión de genes retrovirales endógenos (ERVs) que mejoran la presentación antigénica cuando son expresados. Palbociclib se une a CDK4/6 inhibiendo esta vía conllevando una inhibición de la progresión del ciclo celular y promoviendo la expresión de ERVs que mejoran la presentación antigénica. (2) Palbociclib se une a CDK4/6, impide que se fosforile y active la proteína Forkhead Box M1 (FOXM1) y esta no realiza sus funciones implicadas en división celular, supresión de senescencia y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). (3) CDK6 inhibe la 6-fosfofructoquinasa (PFK1) y la piruvato quinasa M2 (PKM2) que conlleva una producción de agentes de defensa de ROS como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y glutatión; palbociclib al unirse a CDK6 impide la defensa frente a ROS por esta vía. (4) Palbociclib se une a la proteína Ecm29 e impide que esta reprima el proteasoma por lo que se activa la actividad proteasómica que degrada proteínas implicadas en la proliferación.

Asimismo, las propiedades químicas de este fármaco también contribuyen a la inducción de senescencia. Debido al pKa (media logarítmica de la constante de acidez) de palbociclib, este puede sufrir un fenómeno llamado atrapamiento lisosómico mediante el cual este fármaco cuando no está protonado es permeable a membranas a pH neutro y cuando se protona a pH ácido se vuelve impermeable, así se acumula reversiblemente en los lisosomas y otros compartimentos ácidos, creándose un equilibrio entre las membranas celulares. En consecuencia, este almacenamiento y liberación por parte de los lisosomas puede implicar un mayor tiempo de exposición al fármaco manteniendo de forma continua la inhibición de CDK4/6 y promoviendo la senescencia. Además, este fenómeno también sucede en las células resistentes al efecto de palbociclib y se ha observado que estas pueden liberar el fármaco al espacio extracelular produciendo una senescencia paracrina a las demás células sensibles (Llanos *et al.*, 2019).

Respecto a los efectos secundarios observados por palbociclib, los principales efectos indeseados más comunes son neutropenia, leucopenia, fatiga, náuseas, artralgia y alopecia, siendo la sensibilización cutánea una manifestación poco común (Finn *et al.*, 2016).

1.2.2. Paclitaxel

Paclitaxel es un fármaco quimioterapéutico del grupo de los taxanos ampliamente empleado en la clínica. Se ha utilizado para tratar muchas formas de cáncer, incluidos los cánceres de mama, ovario y pulmón (Mekhail y Merkmán, 2002). Este compuesto activo se identificó como agente antitumoral a partir de un extracto del árbol *Taxus brevifolia* (Wani *et al.*, 1971) y la Agencia de Medicamentos y Alimentación (FDA) lo aprobó para el tratamiento cáncer de mama en el 1994. Actualmente es el agente quimioterapéutico más utilizado en este tipo de cáncer, principalmente metastásico (Zhuang *et al.*, 2016). El principal mecanismo de acción de paclitaxel es antimitótico ya que detiene el ciclo celular e induce apoptosis inhibiendo la función de los microtúbulos.

Los microtúbulos son esenciales para numerosos procesos celulares como el crecimiento y división celular, el tráfico celular, señalización celular o la motilidad. Están formados por protofilamentos constituidos por heterodímeros de alfa y beta tubulina. Estos heterodímeros con GTP (guanosín trifosfato) se activan y forman un polímero estable, pero cuando se hidroliza el GTP a GDP (guanosín difosfato), se desestabilizan las uniones y el microtúbulo se desensambla. Esta capacidad de polimerización dinámica permite al microtúbulo crecer y decrecer para poder cumplir con sus funciones. (Jordan y Wilson, 2004; Kueh y Mitchison, 2009). Para poder llevar a cabo la mitosis, son esenciales los microtúbulos ya que estos forman el huso mitótico cuya función es asegurar la segregación cromosómica en la anafase (Foley y Kapoor, 2013).

Paclitaxel promueve la apoptosis celular mediante dos mecanismos de acción principales. El principal de ellos es a través de la unión a la subunidad de beta tubulina del microtúbulo, de este modo estabiliza la estructura impidiendo su desensamble e inhibiendo que realice su función, en consecuencia, se bloquea la mitosis de forma sostenida, lo que desencadena la señalización molecular intrínseca de apoptosis (Zhang *et al.*, 2014). Se han sugerido distintas explicaciones por las que este antineoplásico genere dicha estabilización como que estabilice el microtúbulo fortaleciendo las interacciones laterales de los protofilamentos adyacentes (Nogales *et al.*, 1999; Protá *et al.*, 2013), que confiera al microtúbulo flexibilidad, reduciendo la tensión y aumentando la estabilidad (Mitra y Sept, 2008), o que induzca una conformación similar a cuando se encuentra el GTP sin hidrolizar (Elie-Caille *et al.*, 2007), entre otros.

El segundo de ellos es mediante la unión a la proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) que consta de un sitio de unión homólogo al sitio por el que se une paclitaxel a la beta tubulina (Ferlini *et al.*, 2009). La proteína Bcl-2 es un elemento antiapoptótico que regula negativamente el complejo de poros de transición de permeabilidad y así evita la permeabilización de la membrana externa mitocondrial para que no se liberen al citosol las proteínas Citocromo C o Smac, que desencadenan la vía de señalización directa a la apoptosis (Montero y Letai, 2018). De este modo, al producirse la unión entre el fármaco y Bcl-2 la función de esta proteína se bloquea y se revierte, facilitando la liberación de las proteínas necesarias para desencadenar la apoptosis (Ferlini *et al.*, 2009). Además, se ha observado que paclitaxel al intervenir en la permeabilidad del poro de transición de las mitocondrias, altera el potencial de membrana y causa una liberación de calcio mitocondrial hacia el citosol, esta acumulación de calcio citosólico causa estrés celular, lo que promueve de forma adicional la muerte celular (Kidd *et al.*, 2002).

Por otro lado, paclitaxel también tiene la capacidad de modular la respuesta inmune del microambiente del tumor. Este antineoplásico actúa como agonista del lipopolisacárido y se une a su receptor, el Receptor tipo Toll 4 (TLR4), así puede activar a los macrófagos del microambiente que actúan destruyendo las células tumorales y su estimulación induce la secreción de citoquinas que activan otras células inmunitarias como células dendríticas, *Natural*

killer o linfocitos citotóxicos; además, a través del mismo receptor, paclitaxel también estimula la maduración y función de las células dendríticas (Figura 4) (Javeed *et al.*, 2009).

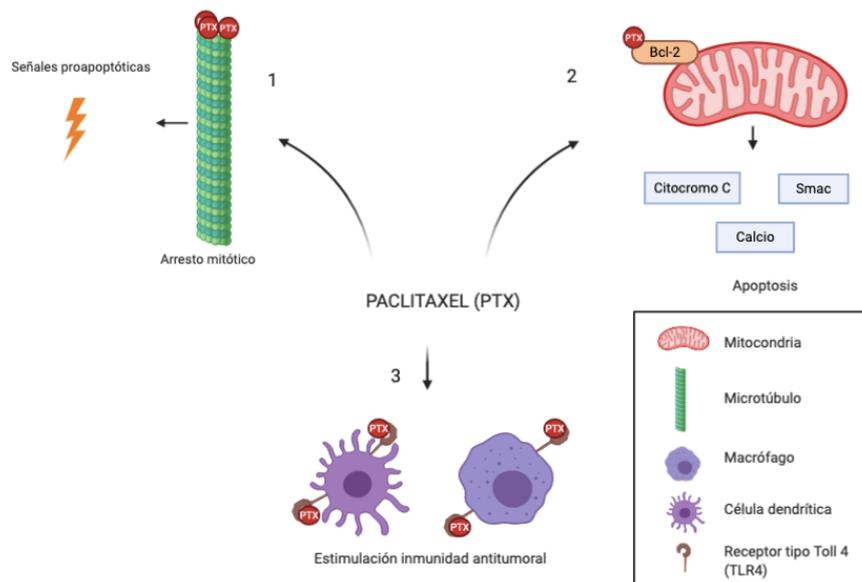


Figura 4. Principales mecanismos de acción de paclitaxel. (1) Paclitaxel (PTX) se une por la beta tubulina a los microtúbulos y los estabiliza impidiendo la mitosis, lo que genera señales proapoptóticas. (2) Paclitaxel se une a la proteína antiapoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) en la membrana mitocondrial, revierte su función y promueve la liberación del Citocromo C, Smac y calcio derivando en apoptosis celular. (3) Paclitaxel activa los macrófagos y las células dendríticas a través del Receptor tipo Toll 4 (TLR4) promoviendo la inmunidad antitumoral.

Como se ha mencionado, paclitaxel es un quimioterapéutico ampliamente utilizado. En cambio, su efectividad se ve condicionada por los numerosos efectos adversos que provoca. Entre los principales efectos adversos se encuentran la neutropenia, fatiga, mialgia o artralgia (Sibaud *et al.*, 2016).

Se sabe que paclitaxel es un potencial inductor de reacciones de hipersensibilidad, provocando reacciones cutáneas significativas. En una recopilación de datos clínicos de paclitaxel (junto con docetaxel) se observó que las reacciones cutáneas como enrojecimiento, prurito y urticaria derivadas de reacciones de hipersensibilidad inmediata se dieron en un 86% de los casos (Caiado y Picard, 2014). Además, se ha informado de distintos efectos adversos dermatológicos que pueden derivarse de la terapia con paclitaxel como pueden ser descamación, lupus eritematoso o eritrodisestesia palmoplantar (Litt y Shear, 2017).

La sensibilización cutánea producida por paclitaxel puede venir desencadenada por su capacidad inmunoestimuladora. Como se ha mencionado, se ha observado que paclitaxel tiene la capacidad de unirse al receptor TLR4, induciendo por un lado la activación de los macrófagos que se diferencian en un fenotipo inflamatorio, y también una maduración de las células dendríticas que posteriormente activarían los linfocitos para dar una reacción inmunitaria. Esta activación en el microambiente tumoral aporta beneficios, sin embargo, en órganos como en la piel puede derivar en una reacción de sensibilización cutánea (Pfannenstiel *et al.*, 2010). Además, cabe destacar que los queratinocitos, principales componentes de la epidermis, tienen una alta susceptibilidad a paclitaxel el cual tiene efecto citotóxico en ellas. Se ha observado que paclitaxel induce apoptosis en queratinocitos activando la cascada de caspasas ya que se ha identificado la activación de la caspasa 8 y 3 después de tratar queratinocitos humanos con este fármaco (Hokeness *et al.*, 2006).

1.3. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA.

La sensibilización cutánea es la consecuencia de una respuesta alérgica inducida por la exposición de la piel a un compuesto químico sensibilizante y normalmente se utiliza para denotar la conocida dermatitis alérgica por contacto en humanos (BINGHAM, 2017). Es un proceso complejo a través del cual se produce una reacción cutánea caracterizada por enrojecimiento, hinchazón y picazón. La sensibilización de la piel se describe en dos etapas: una fase de inducción o sensibilización a través de la cual se generan linfocitos T específicos del alérgeno y una fase de activación en la que se produce la subsecuente reacción inmune exagerada cuando el individuo se reexpone al agente sensibilizante (Strickland *et al.*, 2016).

Aunque no se conoce completamente el mecanismo de sensibilización cutánea, a partir del conocimiento existente la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) ha construido un marco conceptual conocido como *Adverse Outcome Pathway* (AOP) que, centrándose particularmente en los compuestos químicos orgánicos, recoge los distintos eventos clave que componen la fase de inducción: la unión covalente del compuesto químico a proteínas endógenas de la piel, activación de queratinocitos, activación de células dendríticas y proliferación de células T (Figura 5) (OECD, 2012).

Evento clave 1: evento molecular iniciador (haptención)

En la fase de inducción, el compuesto químico (hapteno) penetra en la epidermis y se une de forma covalente e irreversible a proteínas internas de la piel, se produce la haptención, que es el primer evento clave (Roberts y Aptula, 2008). Para que esto ocurra, el compuesto químico debe ser electrófilo. Puede que el compuesto sea de naturaleza electrofílica directamente o que inicialmente sea no reactivo (pre-electrófilo) y se convierta en una sustancia reactiva mediante un proceso abiótico (normalmente oxidación), o que de ser una sustancia no reactiva (pro-electrófilo) se transforme en reactivo por vía del metabolismo (principalmente metabolismo del queratinocito) (OECD, 2012).

De este modo, un compuesto químico electrófilo reacciona con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas. Los electrófilos no reaccionan específicamente con un particular objetivo molecular, es decir, pueden reaccionar con distintos sustituyentes nucleófilos. Así, los sitios nucleofílicos identificados con los que los compuestos químicos sensibilizantes pueden reaccionar son: el grupo tiol de la cisteína y glutatión, átomos de azufre de la metionina, grupos amino primarios de la lisina y arginina, y grupos amino secundarios de la histidina, aunque principalmente la unión covalente se da en residuos de lisina y cisteína (Schwöbel *et al.*, 2011). La identidad y ubicación de las proteínas que sufren esta reacción covalente se desconoce actualmente (Parkinson *et al.*, 2018).

Así, este conjugado final de hapteno-proteína tiene la capacidad activar vías de señalización de células dendríticas y queratinocitos. Este primer evento puede ser analizado con el Ensayo de Reactividad Peptídica Directo (DPRA).

Evento clave 2: Activación de queratinocitos

Los queratinocitos pueden activarse en respuesta al contacto con el hapteno y/o al complejo hapteno-proteína (Urbisch *et al.*, 2015). De este modo, se activan vías citoprotectoras además de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como la citoquina pro-inflamatoria interleucina 18 (IL-18) (OECD, 2012).

La exposición de los queratinocitos a los compuestos sensibilizantes deriva en la activación de los elementos de respuesta a antioxidantes/electrófilos (ARE/EpRE) los cuales regulan la expresión de distintos genes en respuesta a estrés oxidativo o a compuestos electrófilos. El mecanismo mencionado depende de la vía Keap1/Nrf2 (*Kelch-like ECH-associated protein 1/Nuclear erythroid 2-related factor 2*). La proteína Keap1 está compuesta por residuos de cisteína reactivos, por lo que el compuesto sensibilizante electrófilo se une a Keap1 lo que causa que esta proteína se disocie de la proteína Nrf2. De este modo, la proteína Nrf2 liberada se acumula en el núcleo, interacciona con otras proteínas y actúa sobre los elementos ARE/EpRE que se encuentran en la región promotora de genes citoprotectores como NADPH-quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) o glutatión S-transferasa (GSHST) (Natsch y Emter, 2008; OECD, 2012). Este segundo evento clave se puede analizar mediante ensayos *in vitro* con la línea celular Keratinosens.

Evento clave 3: Activación de células dendríticas

Las células que se encargan de presentar el compuesto químico como antígeno para provocar una respuesta del sistema inmune adaptativo son las células dendríticas. En la epidermis de la piel se encuentran las células de Langerhans que son las células dendríticas inmaduras, y en la dermis se ubican células dendríticas. Estas células dendríticas reconocen el hapteno unido al péptido covalentemente y tienen la capacidad de internalizarlo y procesarlo, de esta forma se inicia la maduración de estas células, lo que conlleva la pérdida de la capacidad de reconocer los conjugados de compuesto químico-proteína, pero se adquiere la competencia para presentar el antígeno procesado a los linfocitos T *naive* mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Ryan *et al.*, 2007). Para que se de esta presentación antigénica, las células dendríticas tienen que migrar al ganglio linfático, donde se encuentran las células T *naive*.

La presencia de quimiocinas y citoquinas es clave ya que además de estimular la maduración, promueven la migración de las células dendríticas. Especialmente las citoquinas epidérmicas interleucina-1beta, el factor tumoral de necrosis-alfa, y la IL-18, dan lugar a la migración de las células de Langerhans de la epidermis a la dermis y a los ganglios linfáticos, y también las quimiocinas derivadas del endotelio linfático como CCL21 y CCL19 guían a las células dendríticas por los vasos linfáticos aferentes hacia el ganglio linfático (Antonopoulous *et al.*, 2008; Ohl *et al.*, 2004).

Durante este proceso de activación de las células dendríticas por exposición a un compuesto sensibilizante, se producen simultáneamente cambios fenotípicos como la secreción de quimiocinas y citoquinas activadoras de los linfocitos T, mayor expresión de receptores de quimiocinas, mayor expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 o CD40, o mayor expresión de moléculas de adhesión intercelular como CD54 para facilitar la activación de los linfocitos T (Kimber *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2007). Este evento clave puede ser testado *in vitro* mediante el Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT).

Evento clave 4: Proliferación de células T

Como se ha indicado, las células dendríticas activadas se dirigen al ganglio linfático local para darse el paso final de la fase de sensibilización. Una vez allí, se produce una primera señal de activación y diferenciación de los linfocitos T, las células dendríticas presentan el complejo hapteno-proteína procesado a través del CMH y se reconoce por los receptores de las células T. Otras señales adicionales de activación se dan por el reconocimiento de las moléculas coestimuladoras presentadas por la célula dendrítica, como CD86 o CD40 reconocidas por la molécula CD28 de los linfocitos T; y por la secreción de citoquinas por parte de las células dendríticas. De este modo, esta interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T

conduce a que se activen y diferencien las células T en linfocitos T efectoras de clase CD8+ que son los citotóxicos y de clase CD4+ que son los reguladores, además de generarse células T efectoras de memoria. Estos linfocitos diferenciados y específicos migran a la piel para actuar rápidamente y desencadenar la inflamación cuando se da una nueva exposición a este agente sensibilizante por la fase de activación (Vocanson *et al.*, 2009). Este último evento clave puede ser testado por un ensayo *in vivo*.

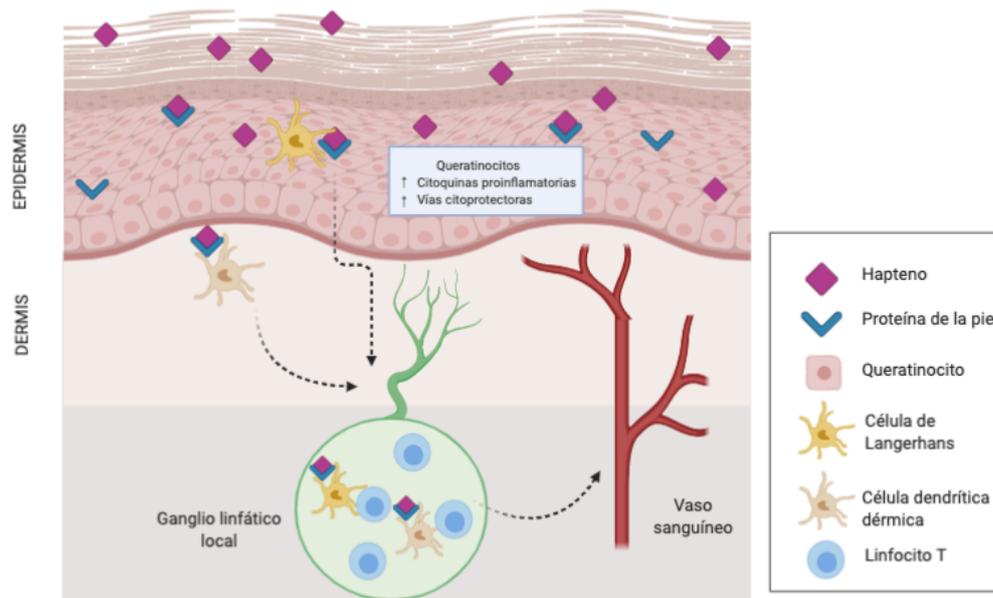


Figura 5. Representación de la fase de inducción de la sensibilización cutánea. El primer evento clave se basa en la unión del hapteno (compuesto químico) a una proteína endógena de la piel. En el segundo evento clave los queratinocitos que componen la epidermis se activan en respuesta al contacto con el hapteno y/o al complejo hapteno-proteína produciendo citoquinas pro-inflamatorias y activando vías citoprotectoras. En el tercer evento clave, las células de Langerhans y las células dendríticas de la dermis procesan el complejo hapteno-proteína, maduran y se dirigen al ganglio linfático local para activar los linfocitos T. Finalmente, en el cuarto evento clave los linfocitos T son activados, proliferan y migran a la piel.

Aunque el proceso de sensibilización que se acaba de exponer se basa en la aplicación tópica, es decir, en efectos directos, este proceso de sensibilización de la piel puede ocurrir por un mecanismo indirecto a partir de la administración sistémica de un compuesto químico. De este modo, un fármaco administrado por ejemplo por vía oral puede propagarse hasta alcanzar la piel a través de la circulación sistémica y puede acumularse allí pudiendo desencadenar efectos adversos cutáneos que incluyen el mencionado mecanismo de sensibilización cutánea (Hardwick *et al.*, 2020).

1.4. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN

Dada la importancia de tal órgano como la piel y el impacto negativo que suponen los efectos adversos dermatológicos, existe un gran interés en poder predecir las posibles alteraciones cutáneas que puede desencadenar un compuesto químico.

Para analizar la capacidad de una sustancia para provocar una sensibilización cutánea, típicamente se han empleado animales de laboratorio. Así, los métodos comunes que se han utilizado a lo largo de los años han sido la Prueba de Maximización del Conejillo de Indias (GPMT), la prueba de Buehler y posteriormente pruebas murinas como el Ensayo del Ganglio

Linfático Local (LLNA) que ha sido el más utilizado, ya que analiza particularmente la fase de inducción y se utiliza un procedimiento menos doloroso para el animal (Frank Gerberick *et al.*, 2007).

Sin embargo, a lo largo de los años el interés por disminuir el uso de animales de laboratorio ha ido creciendo. Esto ha estimulado el desarrollo de numerosos métodos alternativos al uso de animales, ya sean *in chemico*, *in vitro* o *in silico*. Así, entre los métodos alternativos adoptados por la OECD y validados por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) están el Ensayo de Reactividad Peptídica Directo (DPRA), el método de prueba de luciferasa ARE-Nrf denominado Keratinosens y el Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT) (BINGHAM, 2017). Cada uno de los mencionados métodos aborda un evento clave del AOP y para discernir entre un compuesto sensibilizante y uno no sensibilizante la información obtenida por estos métodos es empleada en conjunto y combinada con otras fuentes de información, como puede ser la información de la herramienta QSAR Toolbox (OECD, 2019).

De este modo, la OECD ha establecido un enfoque definido llamado "2 de 3" en el que para identificar si un compuesto es o no sensibilizante se combina la información obtenida de tres métodos que cubran cada uno un evento de los tres primeros eventos clave de la AOP. Para llegarse a una clasificación, al menos dos de los tres resultados deben ser concordantes. Así, los métodos que incluye son para el primer evento clave DPRA, para el segundo Keratinosens y para el tercero h-CLAT (OECD 2019).

1.4.1. Ensayo directo de reactividad peptídica (DPRA)

El DPRA es un procedimiento *in chemico* que evalúa el evento molecular iniciador, es decir, la haptención del mecanismo AOP de sensibilización cutánea. Como ya se ha mencionado, en este primer evento clave el compuesto químico electrófilo reacciona covalentemente con los grupos nucleófilos de los residuos de lisina y cisteína de las proteínas endógenas de la piel. Así, la técnica de DPRA se basa en incubar el compuesto a testar con péptidos de lisina y cisteína sintéticos, con el objetivo de cuantificar la cantidad de péptido agotado. Cabe destacar que la OECD contempla un modelo de predicción basado solo en la realización del ensayo con el péptido de cisteína, este modelo es el empleado en este trabajo por problemas de precipitaciones al emplear el péptido de lisina (OECD, 2019).

Esta técnica DPRA se realiza mediante HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) y ha demostrado tener una precisión del 80%, una sensibilidad también del 80% y una especificidad del 77%, además de una reproducibilidad en sus predicciones del 80% entre laboratorios y del 85% dentro de los laboratorios (IHCP, 2013; Natsch *et al.*, 2013; OECD, 2019)

Para que el ensayo por DPRA se dé por válido, debe cumplir los siguientes criterios de aceptación establecidos (OECD, 2019):

La ejecución del ensayo con el equipo HPLC debe cumplir los siguientes requisitos:

- La curva de calibración estándar debe tener una $r^2 > 0.99$.
- El valor medio del porcentaje de disminución del péptido de las tres réplicas para el control positivo (aldehído cinámico) debe ser para el péptido de cisteína de entre 60.8 y 100%. Respecto a la desviación estándar (SD) para las replicas del control positivo deben ser menores a 14.9% en el caso de la disminución de cisteína.
- El coeficiente de variación de las áreas de pico del péptido de los controles de referencia (en acetonitrilo) debe ser menor a 15%.

Para que los resultados del compuesto químico a testar se consideren válidos:

- La SD máxima, para las tres réplicas del compuesto químico, para el porcentaje de disminución del péptido de cisteína debe ser menor a 14.9%.
- La media de la concentración de los tres controles de referencia en el solvente adecuado debe ser de 0.50 ± 0.05 mM.

Finalmente, este ensayo clasifica el compuesto testado en cuatro categorías según el porcentaje de disminución del péptido de cisteína, según el modelo de predicción que se muestra en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Modelo de predicción del Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA) con solo cisteína.

Media del % de disminución de cisteína	Clase de reactividad	Predicción DPRA
$0\% \leq \text{media \% disminución} \leq 13.89\%$	No o reactividad mínima	Negativo
$13.89\% \leq \text{media \% disminución} \leq 23.09\%$	Reactividad baja	Positivo
$23.09\% \leq \text{media \% disminución} \leq 98.24\%$	Reactividad moderada	Positivo
$98.24\% \leq \text{media \% disminución} \leq 100\%$	Reactividad elevada	Positivo

Limitaciones de la técnica

Los compuestos químicos a testar no incluyen compuestos metálicos ya que estos reaccionan de forma no covalente con los péptidos. Además, el compuesto químico debe ser soluble en un solvente adecuado a una concentración final de 100mM, en caso de no ser soluble a esta concentración el compuesto químico puede ser evaluado por esta técnica pero a menores concentraciones, teniendo en cuenta que un resultado positivo serviría para respaldar su potencial sensibilizante pero un resultado negativo no podría afirmar que no se de reactividad con el péptido (OECD, 2019).

Cabe destacar que los pro-haptenos que requieren una activación por vía metabólica para desencadenar una sensibilización cutánea no son adecuados para este método de evaluación debido a la ausencia de actividad metabólica. Respecto a los pre-haptenos que requieren una transformación abiótica, la capacidad de DPRA para detectarlos no está clara aunque ha demostrado detectar algunos de ellos (IHCP, 2013).

1.4.2. Keratinosens

Keratinosens es una técnica *in vitro* de análisis del potencial sensibilizante de un compuesto químico basado en el segundo evento clave del proceso del AOP, la activación de queratinocitos (OECD, 2018). Una característica de la activación de queratinocitos por agentes sensibilizantes es la activación de los genes dependientes de la activación de los elementos ARE/EpRE mediada por Nrf2 (Natsch y Emter, 2008). El método Keratinosens aprovecha este mecanismo utilizando una línea celular adherente inmortalizada derivada de queratinocitos humanos (HaCaT) modificada genéticamente. Dicha línea celular está transfectada con un plásmido que consta del gen de la luciferasa, cuya regulación está bajo el control transcripcional del promotor SV40 fusionado a la secuencia ARE del gen *AKR1C2* (*Aldo-keto reductase family 1 member C2*). De este modo, si el compuesto a testar se une a Keap1, Nrf2 será liberada, activará los ARE/EpRE y se expresará el gen reportero de la luciferasa que con el sustrato adecuado emitirá una señal de luminiscencia detectable y cuantificable permitiendo analizar la capacidad del compuesto

químico de activar esta ruta, como se representa en la Figura 6 (Natsch y Emter, 2016; OECD, 2018).

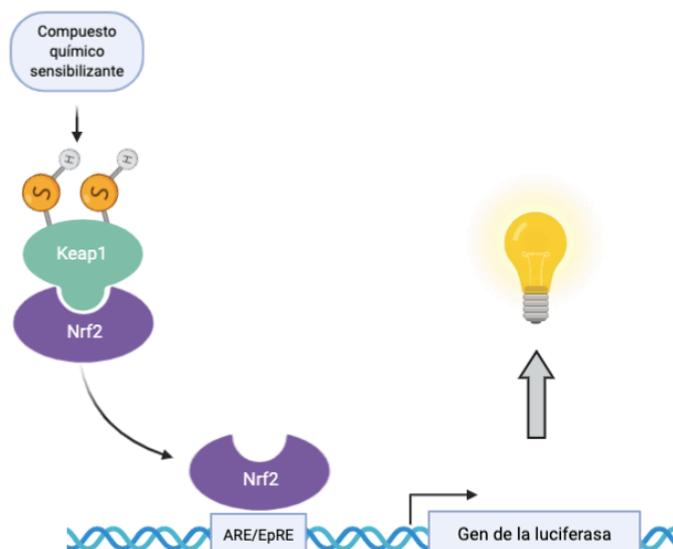


Figura 6. Mecanismo molecular utilizado en Keratinosens. El compuesto químico electrófilo se une a la proteína Keap1 por el grupo tiol (representado por los círculos S unidos a H) de la cisteína, Nrf2 es liberada, se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE/EpRE) y se expresa el gen de la luciferasa.

Además, paralelamente se realiza un ensayo de viabilidad celular mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio) para evaluar la citotoxicidad del químico (OECD, 2018).

Esta técnica ha demostrado una precisión del 77%, una sensibilidad del 78%, y una especificidad de 76%, además de una reproducibilidad en sus predicciones del 86% tanto dentro del laboratorio como entre laboratorios (Griesinger *et al.*, 2014).

Los criterios de aceptación de esta técnica son los que se describen a continuación (OECD, 2018):

- La actividad inducida de la luciferasa en el control positivo aldehído cinámico debe ser estadísticamente significativo superando el umbral de 1.5 al menos en una de las concentraciones testadas (de 4 a 64 μ M).
- El valor EC1.5 (concentración a la cual la inducción de la actividad de la luciferasa es igual a 1.5) para el aldehído cinámico debe estar comprendido entre 7 y 30 μ M. Además, la media de inducción entre las tres réplicas para el aldehído cinámico a 64 μ M debe estar entre 2 y 8.
- El coeficiente de variación promedio de la lectura de luminiscencia para el control del solvente debe ser menor a 20% en cada repetición.

Finalmente, para que la predicción por Keratinosens sea positiva, se deben cumplir, en al menos dos repeticiones, los siguientes puntos (OECD, 2018):

- La I_{max} (inducción de la actividad luciferasa máxima global) debe ser igual o superior a 1.5 y con una diferencia estadísticamente significativa del control negativo.
- La viabilidad celular debe ser superior al 70% en la menor concentración con una inducción de la actividad luciferasa mayor o igual a 1.5.
- El EC1.5 debe ser menor a 1000 μ M.

Limitaciones de la técnica

El compuesto químico testado debe ser soluble o formar una dispersión estable en el solvente utilizado. Cabe destacar la limitación en el mecanismo de esta técnica ya que se basa en que los compuestos sensibilizantes electrófilos reaccionen de forma covalente principalmente con la cisteína de la proteína Keap1, sin embargo, puede haber electrófilos que tengan más afinidad por otro tipo de nucleófilos, como la lisina. Además, los pro-haptenos y pre-haptenos tienen una detección limitada debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular utilizada y las condiciones experimentales, respectivamente (OECD, 2018).

1.4.3. Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT)

El método h-CLAT es un ensayo *in vitro* que analiza la capacidad de un compuesto químico para desencadenar sensibilización cutánea mediante la representación del tercer evento clave del AOP, la activación de células dendríticas (OECD, 2018). Como ya se expuso, las células dendríticas tienen la capacidad de reconocer el complejo generado por la unión del compuesto químico y las proteínas de la piel, activándose y cambiando su fenotipo. Uno de los cambios representativos es la expresión de marcadores de superficie de membrana como son el CD86 y CD54. Esta técnica se beneficia de este mecanismo ya que su predicción se basa en analizar estos biomarcadores. Debido a la dificultad en la obtención de las células dendríticas y a que su empleo rutinario en técnicas de sensibilización cutánea todavía supone problemas, se utiliza la línea celular de leucemia monocítica aguda THP-1 (Sakaguchi *et al.*, 2008).

Estas células THP-1 han demostrado su potencial para mimetizar a las células dendríticas, así, después de su exposición a compuestos sensibilizantes se activan expresando los marcadores de superficie CD86 y CD54 (Figura 7) (Miyazawa *et al.*, 2007). De este modo, las células THP-1 se incuban con el compuesto a testar y posteriormente se cuantifican los cambios en los marcadores de superficie utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos específicos de CD86 y CD54 mediante citometría de flujo. Al emplear células, además se realiza una medición de citotoxicidad empleando la tinción con yoduro de propidio que tiñe las células no viables (OECD, 2018).

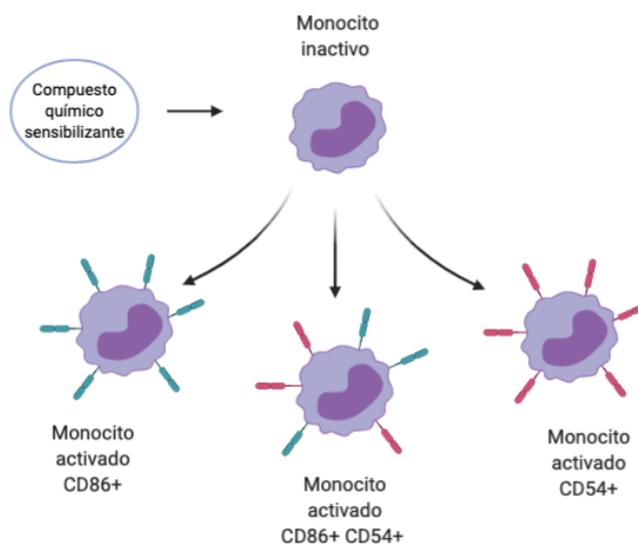


Figura 7. Activación de la célula THP-1 por un compuesto químico sensibilizante. Al activarse el monocito por un sensibilizante se expresan los marcadores de superficie CD86 y CD54.

Como las demás técnicas, h-CLAT también está sujeta a unos criterios de aceptación que se presentan a continuación (OECD, 2018):

- La viabilidad celular en los controles de solvente debe ser superior al 90%.
- En los controles del solvente el valor la intensidad de fluorescencia relativa (IFR) para CD86 y CD54 no debe sobrepasar el 150% y el 200% respectivamente.
- En los controles positivos (2,4-dinitroclorobenceno y sulfato de níquel) el valor IFR para CD86 y CD54 debe sobrepasar el 150% y el 200% respectivamente con una viabilidad celular superior al 50%.

Respecto al modelo de predicción, el resultado finalmente se considerará positivo en el caso de que una de las siguientes condiciones se cumpla en al menos dos ejecuciones independientes (OECD, 2018):

- El valor de IFR de CD86 debe ser $\geq 150\%$ al menos en una concentración del compuesto a testar y con una viabilidad celular \geq al 50%.
- El valor de IFR de CD54 debe ser $\geq 200\%$ al menos en una concentración del compuesto a testar y con una viabilidad celular \geq al 50%.

Esta técnica ha demostrado una precisión de 85%, una sensibilidad del 93%, y una especificidad de 66%, además de una reproducibilidad en sus predicciones del 80% tanto dentro del laboratorio como entre laboratorios (IHCP, 2015; OECD, 2018).

Limitaciones de la técnica

El compuesto químico testado debe ser soluble o formar una dispersión estable, pero aquellos productos químicos con un Log Kow (coeficiente de reparto octanol-agua) mayor a 3.5 tienden a dar falsos negativos por lo que un resultado negativo no se considerará (OECD, 2018). Además, los pro-haptenos y pre-haptenos evaluados por esta técnica pueden derivar también en falsos negativos debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular utilizada y a las condiciones experimentales, respectivamente (OECD, 2018).

1.4.4. QSAR Toolbox

Por último, está el método *in silico* utilizando la herramienta QSAR (*Quantitative structure activity relationship*) Toolbox de la OECD. Esta herramienta es un software que relaciona la estructura del compuesto químico con la actividad farmacológica y tóxica, ayudando así en la evaluación de la toxicidad de productos químicos. Esta aplicación incorpora conocimiento teórico, datos experimentales y herramientas computacionales procedentes de varias fuentes. Así, esta aplicación permite llenar la ausencia en los datos de toxicidad de una sustancia de interés mediante un flujo de trabajo definido con unos pasos principales de: identificación de las características estructurales relevantes del compuesto químico de interés, identificación del posible mecanismo de interacción tóxico, la identificación de otros compuestos químicos con estructura y modo de acción similares y el uso de información previa y datos experimentales de los compuestos identificados como similares para dar una predicción. En esta aplicación se encuentra la opción de un flujo de trabajo automático que puede aplicarse para la predicción de sensibilización cutánea de un compuesto de interés (OECD, 2020).

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Los objetivos generales de este trabajo son:

- Analizar la capacidad sensibilizante de palbociclib mediante las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox.
- Analizar la capacidad sensibilizante de paclitaxel mediante las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox.
- Determinar si la combinación de las técnicas empleadas construye un buen modelo predictivo para testar futuros antineoplásicos.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

En la siguiente Tabla 2 se clasifican los reactivos utilizados y materiales con sus respectivas referencias.

Tabla 2. Reactivos y materiales utilizados junto con sus referencias.

REACTIVO	REFERENCIA
2,4-Dinitroclorobenceno (DNCB)	Sigma Aldrich, 237329-10G
6-Metilcumarina	Sigma Aldrich, M36203
Acetonitrilo	Sigma Aldrich, 439134
Ácido láctico	Sigma Aldrich, W261114-1KG-K
Aldehído cinámico	Sigma Aldrich, W228613
Anticuerpo anti CD54	Dako, F7143
Anticuerpo anti CD86	Dako, F7205
Anticuerpo anti IgG	Dako, X0927
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma Aldrich, 34869-1L-M
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), low glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	Gibco, 11570586
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Biowest, L0615-500
Estreptomina	Lonza, DE 17-602E
Fetal bovine serum (FBS)	GE Healthcare Life Sciences, SV30160.03
Fetal Calf Serum (FCS)	Amimed, 2-01F00-I
Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/mL)	Gibco, 11558616
Globulina	Sigma- Aldrich, G2388-10G
Isopropanol	Sigma Aldrich, I9516-25ML
Keratinosens	Givaudan Schweiz AG
Línea celular THP-1	LGC Standars, ATCC-TIB-202
Luciferase Assay System 10-pack	Promega, E1501
Paclitaxel	MedChemExpress, HY-B0015
Palbociclib	Selleckchem, S1116
Passive Lysis 5X Buffer	Promega, E1941
Péptido sintético de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH)	Genosphere Biotechnologies
Placa 96 pocillos opaca	Greiner Bio-One, 655083
Placa 96 pocillos transparente	Sigma Aldrich, CLS3595- 50EA
Placa transparente 24 pocillos	Corning, 3526
RPMI (Medio Roswell Park Memorial Institute)-1640	ATCC, 30-2001
Staining buffer	Invitrogen, 00-4222-26
Sulfato de níquel	Sigma Aldrich, N4882-1KG
bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio (MTT)	Sigma Aldrich, M2128-1G
TrypLE™ Select Enzyme (1X)	Gibco, 12563029
Vial de cristal	Agilent Technologies, 5190-9062
Yoduro de propidio	Sigma Aldrich, P4170-100MG

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo celular

3.2.1.1. Keratinosens

En el cultivo rutinario de la línea transgénica Keratinosens se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), low glucose, Glutamax™ Supplement, pyruvate con 9,1% de FCS y con Geneticin™ Selective Antibiotic en frascos de 75 cm². Las células se incubaron y se mantuvieron hasta alcanzar la confluencia deseada.

3.2.1.2. THP-1

Para el cultivo rutinario de las células monocíticas humanas de leucemia THP-1 se utilizó el medio RPMI-1640 con suplemento de 10% de FBS, con un cóctel de 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Se emplearon frascos de 175 cm² y se dejaron crecer hasta alcanzar la confluencia deseada.

3.2.2. Técnicas de sensibilización cutánea

3.2.2.1. Ensayo directo de reactividad peptídica (DPRA)

En DPRA, primero se preparó la solución en fresco del péptido de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) a una concentración final de 0.667mM a un pH de 7.5 en tampón fosfato (100mM).

Posteriormente se prepararon las mezclas de cisteína con el compuesto a testar. La OECD indica que los compuestos a testar deben incubarse con la solución de cisteína con una relación 1:10, con una concentración del péptido de 0.5mM y 5mM del compuesto a testar enrasando con acetonitrilo. Sin embargo, a partir de los antineoplásicos llegar a esta concentración es una gran dificultad y provoca problemas de precipitación. De este modo, se prepararon mezclas con el péptido de cisteína con palbociclib a concentración 0.5mM y 1mM, y mezclas con el péptido de cisteína con paclitaxel también a concentraciones de 0.5mM y 1mM (tres replicas por concentración). Respecto a los controles, se realizaron cuatro controles para verificar que la técnica funcionara correctamente: DNCB y aldehído cinámico como controles positivos y ácido láctico y 6-metilcumarina como controles negativos, todos ellos a una concentración de 5mM en la mezcla con el péptido, como indica la OECD. También se realizó un control de referencia de la solución peptídica a 0.5mM con el solvente utilizado (acetonitrilo) para verificar que el solvente utilizado para disolver los productos químicos no afectaba a la disminución peptídica. Se realizaron tres réplicas por control.

Además, para poder realizar este ensayo, se elaboró una curva de calibrado del péptido por lo que se prepararon las diluciones del péptido cubriendo el rango de 0.534mM a 0.0167mM. Para ello, la primera dilución se preparó a partir de la dilución madre de cisteína a 0.667mM junto con acetonitrilo (cantidad del 20% del volumen total). A partir de esta primera dilución se realizaron las demás de forma seriada y con un tampón de dilución compuesto por de tampón fosfato (80%) y acetonitrilo (20%). También se incluyó en la curva un blanco del tampón de dilución.

Todas estas mezclas se incubaron en viales de cristal adecuados para la inyección, en oscuridad y a una temperatura de 22.5-30°C durante 24±2 horas antes de realizar el análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Transcurridas las 24 horas se procedió a analizar la curva patrón, los controles y las muestras. Para ello se hizo uso de un equipo de HPLC (Shimadzu 10AD) con una columna de fase reversa Zorbax SB-C-18 2,1mm x 100 mm x 3,5µm (Agilent, 861753-902) conectado a un detector ultravioleta (Shimadzu 10AV) para medir la absorbancia a una longitud de onda de 220 nm. Este HPLC previamente se equilibró a 30°C con una fase móvil de 50% de fase A (0.1%(v/v) ácido trifluoroacético en agua) y 50% de fase B (0.085%(v/v) ácido trifluoroacético en acetonitrilo). Para el análisis se fijó un flujo de 0.35 mL/min, con un volumen de inyección de 10µL, empleando un gradiente lineal de 10 a 25% de acetonitrilo durante los primeros 10 minutos y después se incrementó rápidamente a 90% de acetonitrilo para eliminar posibles restos de muestra de la columna.

A continuación, se determinó la concentración conservada de cisteína calculando el área debajo del pico (de la curva) a partir del cromatograma proporcionado por el HPLC e interpolando en la curva de calibrado hecha previamente. Posteriormente, para obtener el porcentaje de disminución peptídica para cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

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

3.2.2.2. Keratinosens

Para esta técnica se realizó dos veces el mismo experimento de forma independiente.

Cuando las células de Keratinosens llegaron a una confluencia de 80-90%, se tripsinizaron con TrypLE™ Select Enzyme (1X) y se sembraron a una concentración de 10.000 células/pocillo en 3 placas opacas y 1 placa transparente, las tres de 96 pocillos, dejando un pocillo en cada placa como blanco (solo contendría medio sin células ni compuesto). Las células se incubaron con DMEM 9.1% de FCS sin antibióticos durante 24 horas. Posteriormente, se prepararon las distintas concentraciones de los compuestos a testar, palbociclib a 50ng/mL, 100ng/mL y 150ng/mL y paclitaxel a 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL, 1000ng/mL y 10000ng/mL realizadas con medio DMEM con 1% de FCS sin antibióticos. También se prepararon los controles, se utilizaron el DNCB a 7.8, 3.91, 1.95 y 0.98 µM y aldehído cinámico a 4, 8, 16, 32 y 64 µM como controles positivos y como controles negativos el ácido láctico a 1000 µM e isopropanol a 1000 µM. Además, en este ensayo también se hicieron controles negativos empleando pocillos con células con medio sin compuesto químico que también servirían como control del solvente. De este modo, se retiró el medio de los pocillos y las células se incubaron con los productos a testar y los controles a las concentraciones indicadas por triplicado en luminiscencia y por duplicado en el ensayo de viabilidad, durante 48h a 5% de CO₂ y a 37°C.

Para el ensayo de la luciferasa con las placas opacas, se empleó el kit Luciferase Assay System 10-pack y Passive Lysis 5X Buffer. Primero, se retiró el sobrenadante de los pocillos y se lavaron las placas dos veces con DPBS para eliminar bien los restos de medio. Después se añadieron 20µl de solución de lisis en cada pocillo y se dejó incubando 20 minutos a temperatura ambiente en agitación. Transcurridos los 20 minutos, se añadieron 50 µl de sustrato a cada pocillo y finalmente se midió la luminiscencia en el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech).

A partir de los datos obtenidos por el luminómetro, se calculó la inducción de la actividad de luciferasa utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Inducción actividad luciferasa} = \frac{L_{\text{muestra}} - L_{\text{blanco}}}{L_{\text{solvente}} - L_{\text{blanco}}}$$

donde:

$L_{muestra}$ = Lectura de la luminiscencia en el pocillo testado

L_{blanco} = Lectura de la luminiscencia en el pocillo sin células ni compuesto

$L_{solvente}$ = Media de las lecturas de luminiscencia del control negativo que contiene células y solvente pero no contiene compuesto.

Después, a partir de la inducción de la luciferasa calculada para cada pocillo se calculó la inducción de la luciferasa máxima global ($I_{máx}$) de cada concentración como el promedio de la inducción de las réplicas.

Finalmente, para poder comparar la inducción de la actividad de luciferasa entre los compuestos se calculó el valor EC1.5 que representa la concentración a la cual la $I_{máx}$ alcanza el umbral 1.5, con la siguiente fórmula:

$$EC1.5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

donde:

C_a = Menor concentración (en μM) con una $I_{máx}$ mayor a 1,5.

C_b = Mayor concentración (en μM) con una $I_{máx}$ menor a 1,5.

I_a = Es el valor de $I_{máx}$ para la menor concentración en μM con una $I_{máx}$ mayor a 1,5 (C_a)

I_b = Es el valor de $I_{máx}$ para la mayor concentración en μM con una $I_{máx}$ menor a 1,5 (C_b)

Para el ensayo de viabilidad con la placa transparente, el sobrenadante se sustituyó por medio fresco DMEM con 1% de FCS sin antibióticos. Se añadieron a cada pocillo 27 μ l de la solución MTT (5mg/mL en DPBS) y se incubó durante 4h en oscuridad al 5% de CO₂ y 37°C. Posteriormente se retiró el medio, se añadieron 100 μ l de DMSO y se dejó incubando durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia a 600nm en el espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan) y se calculó la viabilidad celular con la siguiente fórmula:

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

donde:

$V_{muestra}$ = Lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo del compuesto testado.

V_{blanco} = Lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo que no contiene células ni compuesto a testar.

$V_{solvente}$ = Lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo que contiene células y el solvente.

Posteriormente, a partir de estos datos de viabilidad obtenidos se calculó la concentración mínima necesaria para provocar una disminución en la viabilidad celular del 50% (IC₅₀) y para una disminución del 30% (IC₃₀) según la siguiente fórmula:

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

donde:

C_a = Menor concentración (en μM) con una reducción de la viabilidad mayor del X%.

C_b = Mayor concentración (en μM) con una reducción de la viabilidad menor del X%.

V_a = % de viabilidad a la menor concentración con una reducción de la viabilidad mayor al X% (C_a).

V_b = % de viabilidad a la mayor concentración con una reducción de la viabilidad menor al X% (C_b).

3.2.2.3. Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT)

Para esta técnica se realizaron dos veces el mismo experimento de forma independiente.

En la técnica h-CLAT, primero se sembraron las células THP-1 en suspensión utilizando dos placas de 24 pocillos, a una densidad de 500.000 células/pocillo y se incubaron al 5% de CO₂ y a 37°C durante unos 30 minutos. Después, se prepararon por un lado las diluciones de los fármacos a testar, palbociclib a 50ng/mL, 100ng/mL y 150 ng/mL y paclitaxel a 100 ng/mL, 1000ng/mL y 10000ng/mL, y por otro lado los controles, utilizando como controles positivos el DNCB a 2µg/mL y sulfato de níquel a 140µg/mL y como controles negativos el ácido láctico a una concentración de 500µg/mL y el isopropanol a concentración 2500µg/mL. Además, también se realizaron controles negativos que contenían células y medio sin compuesto a testar.

Así, se añadió cada concentración y cada control por triplicado y se incubaron las células durante 24 horas al 5% de CO₂ y a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación de las células de 5 minutos a 4°C y a 1500rpm. Después se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet resultante en 500µl de tampón de bloqueo (Globina 0,01% (p/v) en *Staining Buffer*) para bloquear los receptores Fc. Se dejaron incubando durante 15 minutos a 4°C. Durante este tiempo se prepararon las soluciones de anticuerpos monoclonales de ratón anti-humano conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) con *Staining buffer* en una proporción de 3:25 para el CD86 y una proporción 3:50 para el CD54 y el IgG, este último se utilizó como control de isotipo. Así, una vez transcurrieron los 15 minutos, se añadió cada anticuerpo a cada concentración del fármaco y a cada control (cada anticuerpo en pocillos independientes) y se dejaron incubando durante 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Posteriormente, se realizaron dos lavados con *Staining Buffer* y finalmente se resuspendió el pellet con *Staining buffer* y se añadieron 2µl de yoduro de propidio. Finalmente, empleando el citómetro de flujo (BD LSR Fortessa X-20) a una longitud de onda de 488nm se midió tanto la intensidad de la fluorescencia de FITC de los anticuerpos específicos de los marcadores de superficie de las células (con pico de emisión a unos 525nm), como la viabilidad a través de la fluorescencia del yoduro de propidio (con pico de emisión a unos 620nm).

Para indicar la expresión de los marcadores CD86 y CD54 se utilizó el valor de la IFR (intensidad de fluorescencia relativa) calculado en base a la media geométrica de la intensidad de fluorescencia media (MFI) utilizando la siguiente fórmula:

$$IFR = \frac{MFI \text{ de las células tratadas} - MFI \text{ del control isotipo de las células tratadas}}{MFI \text{ de las células control} - MFI \text{ del control de isotipo en las células control}} \times 100$$

3.2.2.4. Herramienta QSAR Toolbox

El procedimiento escogido en la herramienta QSAR Toolbox versión 4.4 (2020) de la OECD se basó en el trabajo de flujo automatizado. Primero, en el primer módulo de *Input* se insertó un identificador del compuesto a evaluar, el correspondiente SMILES (*Simplified Molecular Input Line Specification*) de palbociclib y paclitaxel, y posteriormente se pasó directamente al módulo *Data gap filling* donde se escogió el modo automático y el punto final de sensibilización cutánea, usando los datos experimentales de pruebas de LLNA y GPMT y se inició todo el proceso para la evaluación. Finalmente, en el módulo *Report* se generó un informe con la predicción final de la sensibilización cutánea para cada compuesto.

4. Resultados y discusión de los resultados

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este trabajo, se analiza la capacidad de provocar sensibilización cutánea de los fármacos palbociclib y paclitaxel, unos de los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama. Para dicho análisis se emplean las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox, integrando la información proporcionada por los resultados obtenidos de cada técnica. De este modo, también se extrae una conclusión sobre si la combinación de las técnicas mencionadas construye un buen modelo predictivo para determinar si un antineoplásico es o no sensibilizante cutáneo. Así pues, se ejecutaron las técnicas mencionadas y para cada ensayo se hizo una comprobación del cumplimiento de los respectivos criterios de aceptación. Los resultados obtenidos son los que se presentan a continuación.

4.1. PALBOCICLIB

4.1.1. Resultados del ensayo DPRA

Una propiedad bien establecida de los compuestos sensibilizantes cutáneos es su capacidad para reaccionar con los grupos nucleofílicos de las proteínas endógenas de la piel, siendo este el primer evento clave para provocar sensibilización cutánea. De esta forma, mediante la técnica DPRA, se determina si el compuesto a testar tiene la capacidad de desencadenar este primer evento clave a partir de su incubación con péptidos, en este caso compuestos por cisteína, midiendo la disminución de la cantidad de péptido por haber reaccionado con el compuesto a testar (OECD, 2019). Según el modelo de predicción de DPRA utilizando solo la cisteína, cuando la media del porcentaje de disminución peptídica se encuentre en el rango de 0 a 13,89% la predicción para el compuesto será negativa. Así, al calcularse los porcentajes de disminución peptídica del péptido de cisteína, como se observa en la Figura 8, los valores para los controles negativos no llegaron a alcanzar el umbral de 13,89% y los controles positivos lo superaron, como se esperaba. Respecto al antineoplásico palbociclib, el valor del porcentaje medio de disminución peptídica para la concentración 0.5mM fue de 0,875% y para la concentración 1mM fue de 2.57%, así, la predicción para este compuesto sería negativa. Sin embargo, dado que se ha realizado el ensayo empleando concentraciones del compuesto a testar menores a 5mM que es la indicada en la OECD, un resultado negativo no podría afirmar que no se de reactividad con el péptido, es decir, podría ser un falso negativo, por lo que, aunque se sugiera una ausencia de reactividad de palbociclib, no se puede establecer una predicción firme por esta técnica.

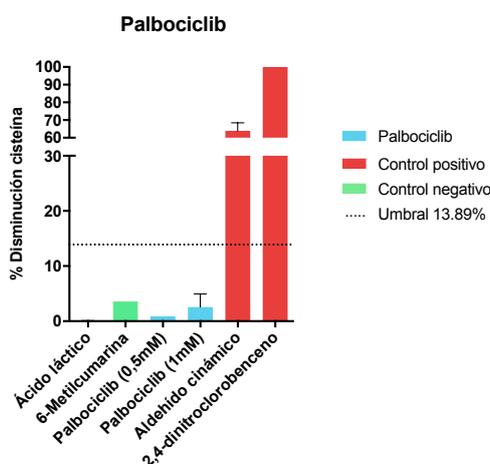


Figura 8. Análisis del potencial sensibilizante de palbociclib por el Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA). Se representan los valores medios ($n=3$) \pm SD del porcentaje de disminución peptídica de palbociclib a distintas concentraciones y de los respectivos controles por la técnica DPRA después de una incubación de 24h con el péptido de cisteína.

4.1.2. Resultados del ensayo Keratinosens

La técnica Keratinosens evalúa la capacidad del compuesto químico a testar para activar los queratinocitos basándose en el mecanismo molecular de la activación de la vía Keap1/Nrf2, la cual se detecta por la inducción del gen de la luciferasa en la línea celular utilizada (OECD, 2018). Se testaron para palbociclib unas concentraciones de 50, 100 y 150 ng/mL, similares a las concentraciones plasmáticas observadas (Tamura *et al.*, 2016). En la Figura 9A se muestran los valores de $I_{máx}$ frente a las distintas concentraciones testadas para palbociclib, así como para los controles positivos y los controles negativos. La exposición de las células keratinosens durante 48 horas a sustancias no sensibilizantes no desencadena la activación de la vía Keap1/Nrf2 y por tanto no se induce una expresión significativa del gen de la luciferasa. En este caso, las concentraciones de palbociclib no muestran una $I_{máx}$ igual o por encima de 1.5, necesario para concluir una predicción positiva según los criterios de la OECD. Los controles negativos también mostraron una $I_{máx}$ menor a 1.5 y los controles positivos superaron este umbral, indicando que la técnica se ha llevado a cabo correctamente.

Respecto a los resultados de viabilidad celular, en la Figura 9B se observa que ninguna concentración testada de palbociclib afecta a la viabilidad celular ya que todas superan el umbral del 70% de viabilidad indicado en la OECD.

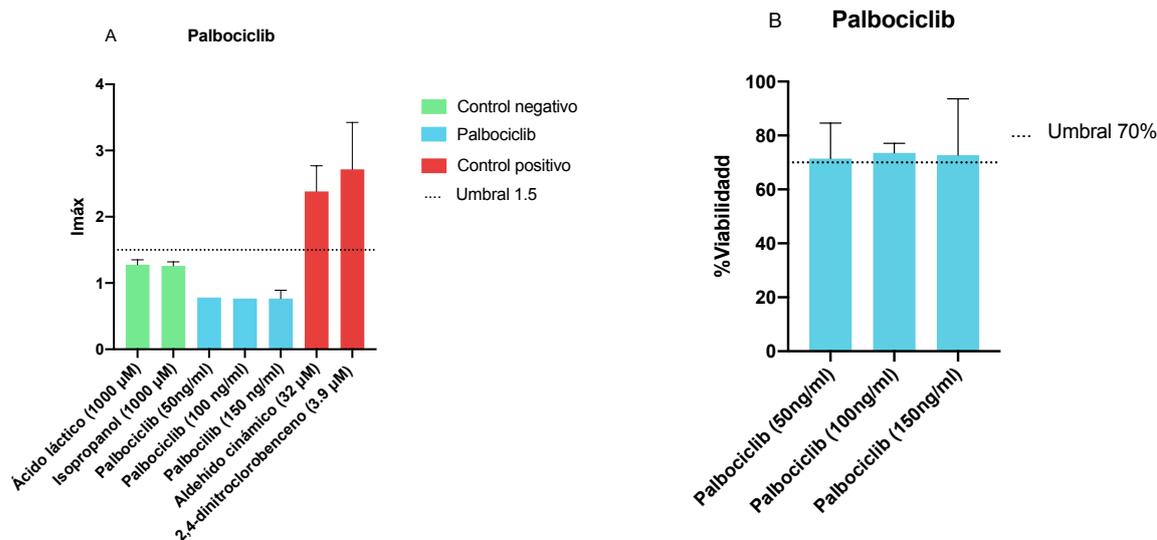


Figura 9. Análisis del potencial sensibilizante de palbociclib por la técnica Keratinosens. Se muestran los efectos producidos por palbociclib a distintas concentraciones y de los respectivos controles en la línea celular keratinosens después de su incubación durante 48h. (A) Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes ($n=3$) para los valores de la inducción de la actividad de la luciferasa máxima global ($I_{máx}$). (B) Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes ($n=2$) para los valores de viabilidad celular.

Según los datos obtenidos, la predicción de palbociclib es negativa por la técnica Keratinosens, es decir, se puede afirmar que este antineoplásico no tiene la capacidad de unirse a la proteína Keap1, lo cual liberaría al factor de transcripción Nrf2 que se translocaría al núcleo, se uniría a los ARE/ EpRE e induciría la expresión de genes citoprotectores; además, tampoco es capaz de generar estrés oxidativo en la célula, lo cual también activaría esta vía Keap1/Nrf2 (Natsch y Emter, 2016). De este modo, los datos obtenidos por esta técnica concuerdan con la información de la literatura donde no se ha encontrado evidencia de efectos producidos por palbociclib en queratinocitos.

4.1.3. Resultados de la técnica h-CLAT

Respecto a la técnica h-CLAT, examina la capacidad de un compuesto químico para activar las células dendríticas midiendo la expresión de marcadores de superficie característicos de dicha activación. A partir de los resultados obtenidos por citometría de flujo, se calculó el porcentaje de IFR para los controles y para cada concentración testada de palbociclib de 50, 100 y 150 ng/mL que son similares a las concentraciones plasmáticas observadas (Tamura *et al.*, 2016).

Como se observa en la Figura 10, los valores de IFR de los controles negativos no alcanzan los umbrales para considerarse positivos. En cambio, los valores de IFR para palbociclib parecen indicar una dosis-respuesta ya que la dosis más alta testada, 150ng/mL, presentó una IFR para CD86 mayor al 150%, y además al presentar una viabilidad mayor al 50%, y por tanto cumplir los requisitos de la OECD para un resultado positivo, la predicción se consideró positiva. Lo mismo ocurre con los controles positivos. Cabe mencionar que en todas las condiciones el porcentaje de viabilidad superó el 50%, sin observarse ninguna tendencia que indicara toxicidad inducida por este fármaco. Aunque no consta en la literatura información sobre la activación de las células dendríticas por palbociclib ni que la sensibilización cutánea sea un efecto adverso común, en el ensayo clínico PALOMA-3 de palbociclib (junto a fulvestrant), el 1% de los pacientes manifestó erupción cutánea de grado 3, es decir, reacción grave pero no mortal, y el 14% manifestaron erupciones cutáneas más leves de grado 1 a 2 (Cristofanilli *et al.*, 2016), por lo que puede que dichos efectos cutáneos se deban a la activación de las células dendríticas observada en h-CLAT, entre otros mecanismos.

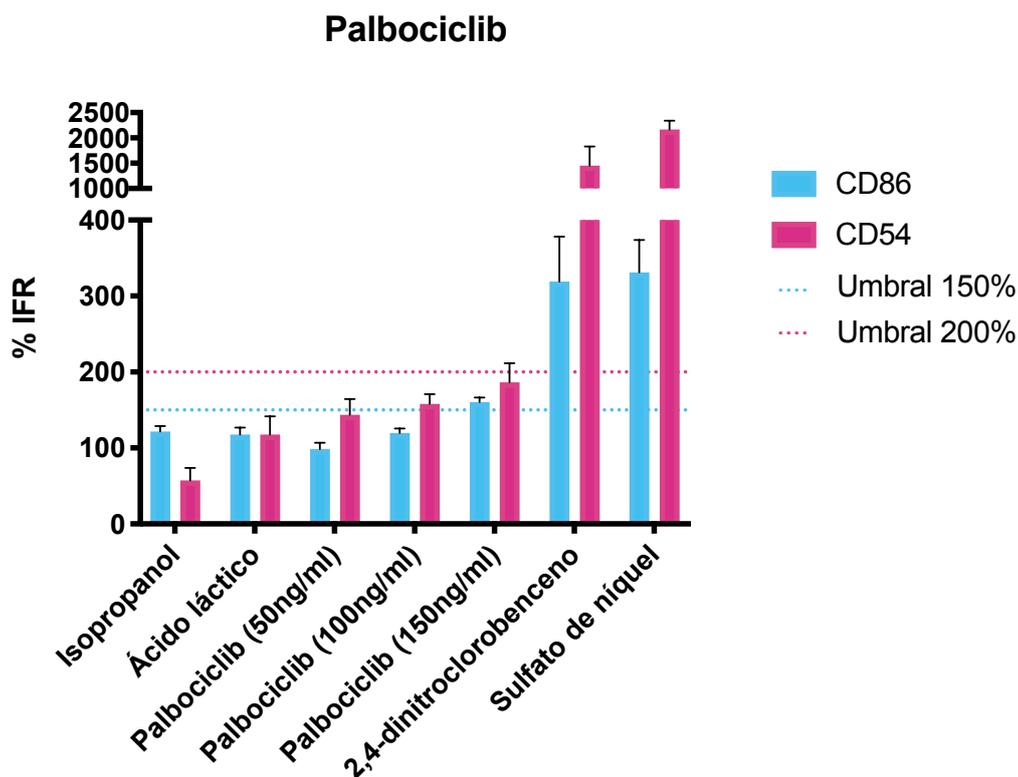


Figura 10. Análisis del potencial sensibilizante de palbociclib por el Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT). Se muestran los efectos producidos por palbociclib a distintas concentraciones y de los respectivos controles en la línea celular THP-1 después de su incubación durante 24h. Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes tanto para los valores intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de CD86 como para CD54.

4.1.4. Resultados QSAR Toolbox

Aunque en el enfoque definido "2 de 3" de la OECD para la identificación de la capacidad de un compuesto químico de producir sensibilización cutánea solo tiene en cuenta los resultados por las técnicas *in chemico* e *in vitro* presentadas, también se llevó a cabo una predicción por el software QSAR Toolbox, para adquirir así información adicional para realizar una mejor valoración de los resultados obtenidos.

La herramienta QSAR por el trabajo de flujo automático, a partir del análisis estructural de la molécula del compuesto a testar y su comparación con la información de distintas bases de datos nos generó una predicción para palbociclib. Primero analizó distintas características del compuesto, como su capacidad de unión a proteínas para el efecto de sensibilización cutánea o sus grupos orgánicos funcionales. A partir de esta información comparando con datos experimentales de LLNA y GPMT de bases de datos de sensibilización cutánea encontró una serie de compuestos análogos que posteriormente subcategorizó definiendo los análogos más similares para generar una predicción para palbociclib a partir de ellos. Como se observa en la Figura 11, QSAR Toolbox creó un gráfico que representa los datos experimentales de los análogos clasificados en positivos o negativos según su capacidad de desencadenar sensibilización cutánea frente a una característica propia de los análogos (de forma predeterminada es el Log Kow) en el eje X. Así, como se observa en el gráfico, palbociclib se clasificó como negativo, por lo que la predicción de palbociclib por QSAR Toolbox es negativa.

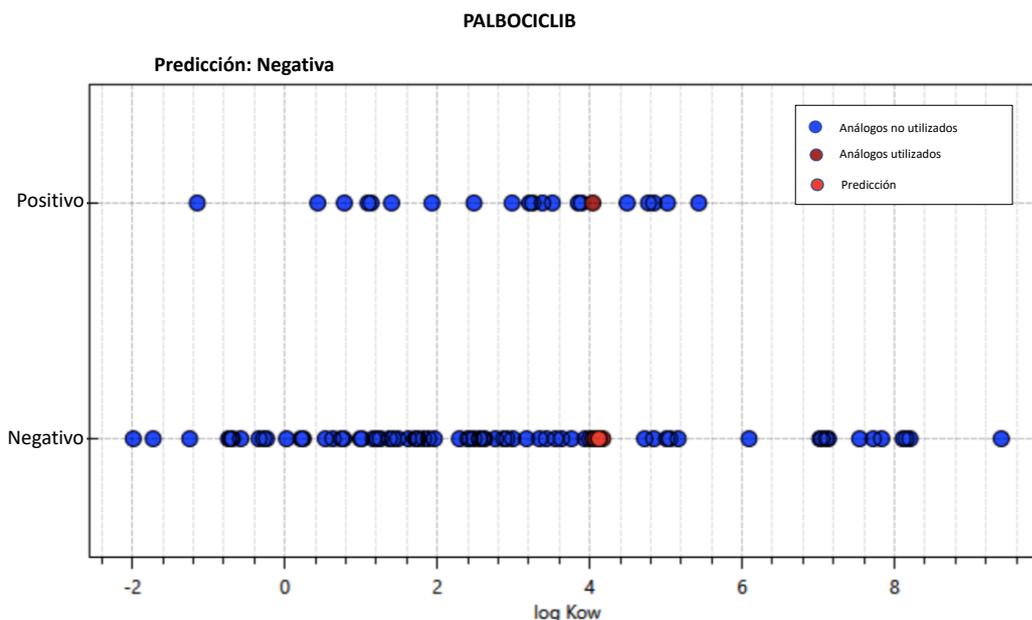


Figura 11. Análisis del potencial sensibilizante de palbociclib por la herramienta QSAR Toolbox de la OECD. Se representa la clasificación en escala de positivos o negativos frente al Log Kow (coeficiente de reparto octanol-agua) de los compuestos químicos análogos tanto utilizados como no utilizados para la predicción del compuesto a testar, y la predicción final del propio compuesto.

Según el enfoque definido "2 de 3", para hacer una predicción sólida, el resultado de al menos dos de las tres técnicas de DPRA, Keratinosens y h-CLAT deben ser concordantes. De este modo, no se puede obtener una predicción firme para este antineoplásico ya que, como se ha mencionado, el resultado de la técnica DPRA no puede darse por válido y los resultados derivados de las otras dos técnicas *in vitro* no son concordantes. Sin embargo, el posible resultado negativo por DPRA se encuentra apoyado por la predicción negativa de la técnica *in*

silico QSAR Toolbox la cual basándose en la estructura química del compuesto analiza la reactividad con proteínas del compuesto a testar.

Teniendo en cuenta esto, junto con los resultados negativos obtenidos por Keratinosens, podría sugerirse que palbociclib no es un potencial inductor de sensibilidad cutánea. Además, esta hipótesis coincidiría con el historial de efectos secundarios observados en la literatura y con la información que presentan ensayos clínicos como el ensayo de fase 2 de monoterapia con palbociclib o el ensayo PALOMA-2 en los que se reportan como principales efectos adversos la neutropenia, leucopenia, anemia o linfopenia, sin mostrar una manifestación significativa y común de reacciones de sensibilización cutánea (DeMichelle *et al.*, 2015; Finn *et al.*, 2016). En todo caso, para poder hacer una predicción confiable de este antineoplásico, se debería realizar el ensayo *in vivo* LLNA que evalúa el cuarto evento clave del mecanismo de sensibilización cutánea.

4.2. PACLITAXEL

4.2.1. Resultados del Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA).

Para poder evaluar si el compuesto paclitaxel era capaz de desencadenar el primer evento clave de la sensibilización cutánea mediante la técnica DPRA, se calcularon los porcentajes de disminución peptídica del péptido de cisteína para las dos concentraciones de paclitaxel 0.5 y 1mM y para los distintos controles. Como se representa en la Figura 12, el valor del porcentaje medio de disminución peptídica para la concentración 0.5mM fue de 67.93% y para la concentración 1mM fue de 85.56%, representando una relación dosis-respuesta. Según el modelo de predicción de DPRA utilizando solo la cisteína, cuando la media del porcentaje de disminución peptídica supere el 13.89% la predicción será positiva. Los valores de disminución peptídica para los controles negativos no superaron dicho umbral, y los controles positivos sí, al igual que el compuesto paclitaxel. Concretamente los valores obtenidos para paclitaxel se ubican en el rango de 23.09 a 98.24% que según el modelo de predicción de DPRA son positivos con reactividad moderada. De este modo, la predicción por DPRA para paclitaxel resultó positiva demostrando su capacidad de reaccionar con proteínas endógenas de la piel.

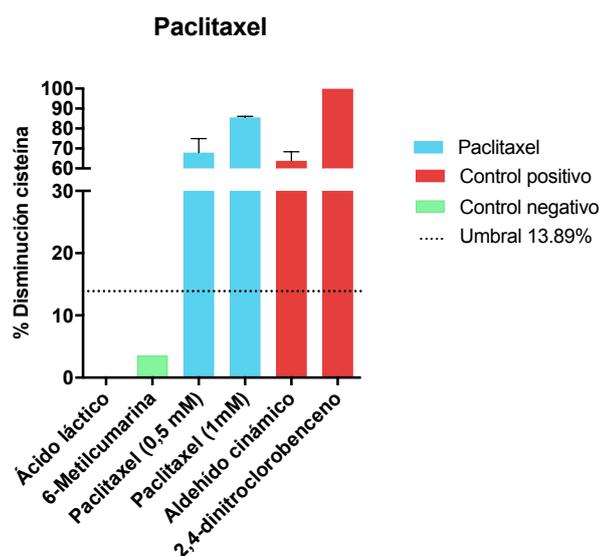


Figura 12. Análisis del potencial sensibilizante de paclitaxel por el Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA). Se representan los valores medios ($n=3$) \pm SD del porcentaje de disminución peptídica de paclitaxel a distintas concentraciones y de los respectivos controles por la técnica DPRA después de una incubación de 24h.

4.2.2. Resultados de la técnica Keratinosens

La activación de los queratinocitos caracterizada por la activación de la vía Keap1/Nrf2 compone el segundo evento clave de la sensibilización cutánea y la técnica que estudia si un compuesto químico es capaz de promover dicho mecanismo es Keratinosens (OECD,2018). Según el modelo de predicción de esta técnica, para que un compuesto tenga una predicción positiva de sensibilizante, primero debe observarse una $I_{m\acute{a}x}$ con un valor mayor o igual al 1.5.

Para el compuesto paclitaxel se testaron, además de las concentraciones plasmáticas más comunes de 100, 1000 y 10000 ng/mL (Borga *et al.*, 2019), dos concentraciones menores de 10 y 1 ng/mL para determinar si este compuesto químico inducía la activación de los queratinocitos o si solo tenía efecto citotóxico sobre ellos, ya que en la literatura se informa de la sensibilidad de estas células frente a paclitaxel (Hokeness *et al.*, 2005).

Al calcular los valores de la $I_{m\acute{a}x}$ para cada concentración testada de paclitaxel, se observó que se superaba el valor de 1.5 salvo en la menor concentración, de 1ng/mL, cumpliéndose así la primera premisa del modelo de predicción (Figura 13A). La viabilidad de la concentración menor de paclitaxel con una $I_{m\acute{a}x}$ mayor a 1.5, como se puede observar en la Figura 13B superaba el 70% y el valor de EC1.5 para este compuesto era menor a 1000 μ M como se representa en la Tabla 3 la cual recoge el análisis numérico de paclitaxel (EC1.5, IC₃₀ e IC₅₀). Además, se obtuvieron los resultados esperados para los controles, negatividad para los controles negativos y positividad para los positivos, indicando que se había realizado el experimento apropiadamente.

De este modo, al cumplirse las condiciones del modelo de predicción, se concluye que paclitaxel es positivo por la técnica Keratinosens, provocando una activación de los queratinocitos. Así, este antineoplásico puede presentar la capacidad de interactuar covalentemente con la proteína Keap1 activando así los ARE/EpRE, sin embargo, este fármaco podría activar esta ruta mediante otro mecanismo ya que se ha observado que paclitaxel puede provocar estrés oxidativo al actuar a nivel de mitocondria, acumulándose ROS que a su vez puede desencadenar la activación de la vía de Keap1/Nrf2 (McCormick *et al.*, 2016). Además, en esta técnica también se observó la influencia del antineoplásico paclitaxel en la viabilidad celular con una relación dosis-respuesta muy marcada. El hecho de que la viabilidad se reduzca drásticamente a medida que se aumentan las concentraciones de paclitaxel explica por qué la $I_{m\acute{a}x}$ se reduce ya que hay menos células vivas. En otros estudios se ha demostrado que los queratinocitos, que componen principalmente la epidermis, son susceptibles a este antineoplásico y que a concentraciones relativamente bajas induce apoptosis de los queratinocitos a través de mecanismos que activan las caspasas 8 y 3 (Hokeness *et al.*, 2005).

De este modo, paclitaxel es un claro activador de los queratinocitos pero también tiene un efecto citotóxico sobre estas células epiteliales dependiendo de la dosis.

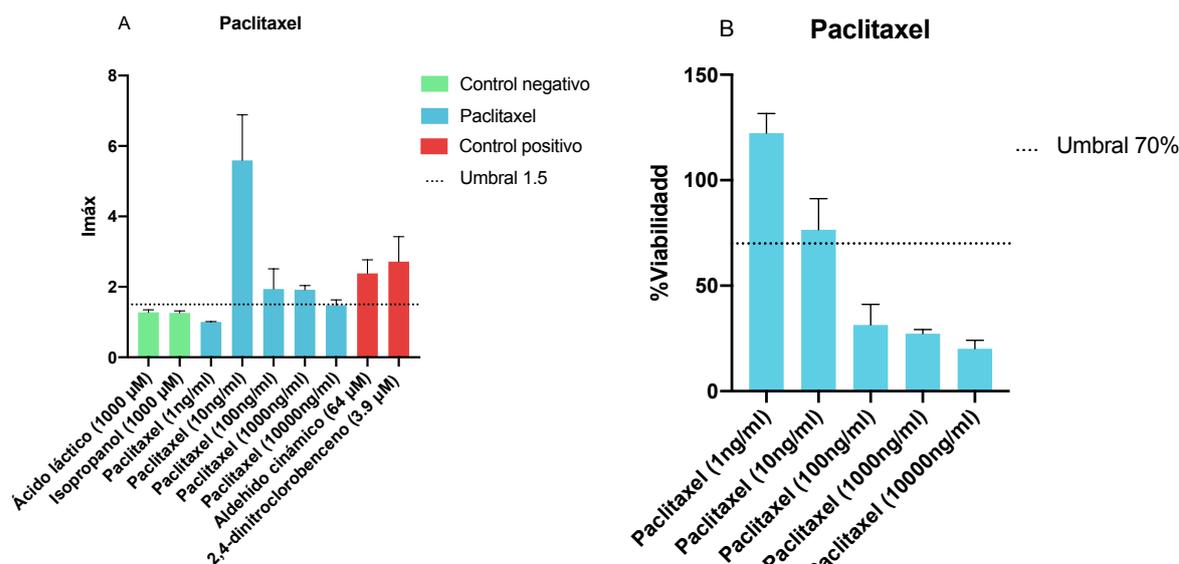


Figura 13. Análisis del potencial sensibilizante de paclitaxel por la técnica Keratinosens. Se muestran los efectos producidos por paclitaxel a distintas concentraciones y de los respectivos controles en la línea celular keratinosens después de su incubación durante 48h. (A) Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes (n=3) para los valores de la inducción de la actividad de la luciferasa máxima global ($I_{m\acute{a}x}$). (B) Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes (n=2) para los valores de viabilidad celular.

Tabla 3. Media de los valores EC1.5, IC₃₀ e IC₅₀ para el compuesto paclitaxel.

Media EC1.5 (µM)	Media IC ₃₀ (µM)	Media IC ₅₀ (µM)
0,0024	0,0297	0,0721

Abreviaturas: EC1.5 es la concentración a la cual se produce una inducción de la actividad de la luciferasa de 1.5; IC₃₀ es la concentración a la cual la viabilidad se reduce un 30%; IC₅₀ es la concentración a la cual la viabilidad se reduce un 50%.

4.2.3. Resultados de la técnica h-CLAT

En la técnica h-CLAT que analiza la activación de las células dendríticas por el compuesto a testar, el modelo de predicción establecido indica que, para una predicción positiva, en al menos dos repeticiones debe cumplirse que el IFR para CD86 sea mayor o igual a 150% o que el IFR para CD54 sea mayor o igual a 200%. Las concentraciones testadas para paclitaxel fueron las concentraciones plasmáticas más comúnmente observadas (Borga *et al.*, 2019).

Como se indica en la Figura 14, con una concentración de 1000 ng/mL de paclitaxel ya se obtuvo un valor de IFR>150 para CD86 con una viabilidad celular mayor al 50%. Además, a la concentración de 10000 ng/mL se observa una activación de las células dendríticas con una IFR>150% para CD86 y una IFR>200% para CD54. Así pues, paclitaxel se considera positivo según la técnica h-CLAT. Lo mismo ocurre con los controles positivos, a diferencia de los controles negativos que no alcanzan los umbrales establecidos, como se esperaba. Respecto a la viabilidad, tanto en los controles como en las distintas concentraciones se superó el 50% de viabilidad, sin detectarse ninguna anomalía que indicara un efecto tóxico para las células dendríticas por paclitaxel.

La activación de las células dendríticas se puede dar por la capacidad de paclitaxel de unirse al TLR4 que mediante cascadas de señalización induce una maduración y mejora de la función de este tipo celular, promoviendo la expresión de los marcadores de superficie como CD54 y CD86 (Pfannenstiel *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que el antineoplásico paclitaxel puede activar en algunos tipos celulares las proteínas p38 MAPK y ERK (Okano *et al.*, 2001) las cuales en las células THP-1 inducen un aumento en la expresión de los marcadores de superficie CD86 y CD54 (Miyazawa *et al.*, 2008).

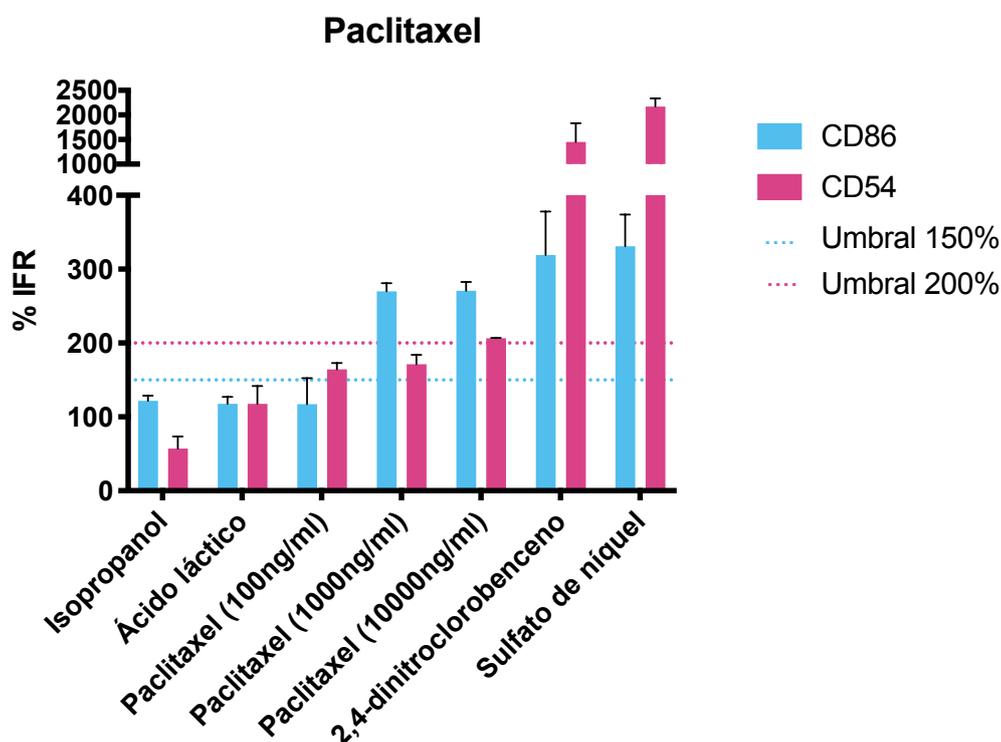


Figura 14. Análisis del potencial sensibilizante de paclitaxel por el Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT). Se muestran los efectos producidos por paclitaxel a distintas concentraciones y de los respectivos controles en la línea celular THP-1 después de su incubación durante 24h. Aparecen representados los valores medios \pm SD de dos experimentos independientes tanto para los valores intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de CD86 como para CD54.

4.2.4. Resultados QSAR Toolbox

Al igual que para palbociclib, para paclitaxel también se obtuvo una predicción por la herramienta QSAR Toolbox para que así, la información generada por este software aportara más fiabilidad al resultado final obtenido por las demás técnicas.

La herramienta QSAR Toolbox por el trabajo de flujo automático, después de realizar un análisis estructural de la molécula, de su competencia para reaccionar con proteínas de la epidermis y hacer una comparación con la información de bases de datos de sensibilización cutánea disponibles, nos proporcionó un gráfico con la predicción final para paclitaxel.

En la Figura 15, además de la predicción de paclitaxel, aparecen clasificados tanto los análogos con más similitud a paclitaxel a partir de los que se generó la predicción final de este compuesto, como los análogos no utilizados para generar la predicción final de paclitaxel en una escala de positivos y negativos según su información de datos experimentales, frente a los distintos valores Log Kow de cada compuesto. Paclitaxel se ubicó en la clasificación de positivos, por lo que paclitaxel por QSAR Toolbox se consideró sensibilizante.

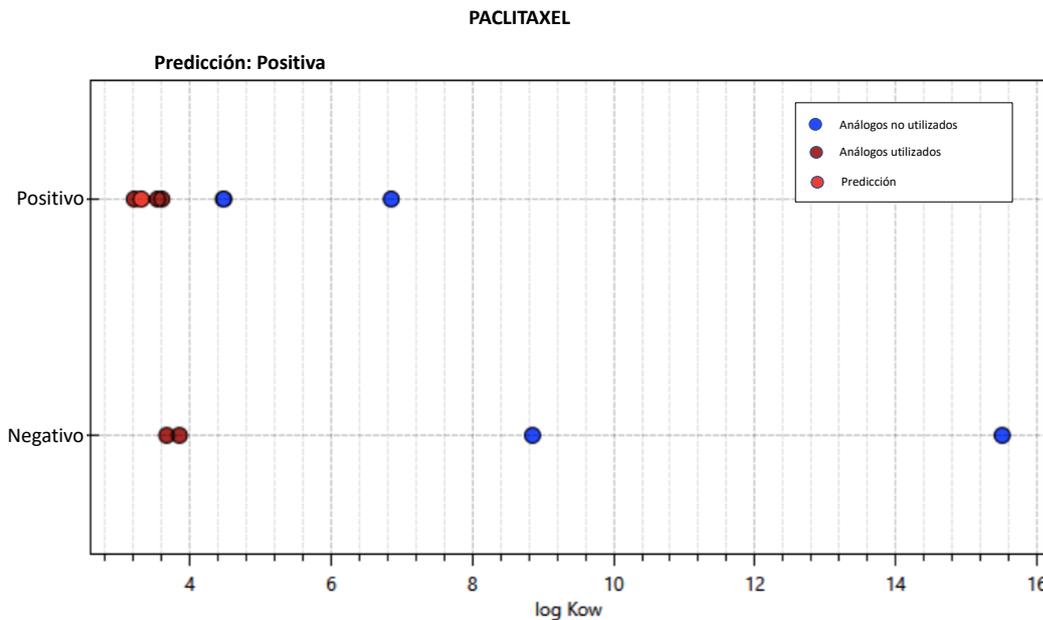


Figura 15. Análisis del potencial sensibilizante de paclitaxel por la herramienta QSAR Toolbox de la OECD. Se representa la clasificación en escala de positivos o negativos frente al Log Kow (coeficiente de reparto octanol-agua) de los compuestos químicos análogos tanto utilizados como no utilizados para la predicción del compuesto a testar, y la predicción final del propio compuesto.

De este modo, la predicción final a partir de la información combinada de todas las técnicas fue que paclitaxel tiene un claro potencial para desencadenar sensibilización cutánea ya que se ha demostrado que es capaz de activar los tres eventos clave que componen este mecanismo de sensibilización el cual conduciría a una posterior respuesta inmunológica. Esta predicción final positiva es concordante con los efectos observados en los ensayos clínicos para paclitaxel en los que se observaron efectos cutáneos como rubor, prurito y urticaria derivados de reacciones de hipersensibilización cutánea en el 86% de los casos (Caiado y Picard, 2014). Además, cabe destacar que este antineoplásico ha estado sujeto a distintas formulaciones para su administración como en base solvente con el aceite de ricino polioxietilado lo cual ha generado incertidumbre sobre el potencial sensibilizante desencadenado por el compuesto activo o por el propio solvente para la administración (Nam Kim *et al.*, 2016), así pues, en este estudio también se aporta evidencia de la capacidad intrínseca del propio compuesto activo para desencadenar sensibilización cutánea.

Por lo tanto, estas técnicas empleadas de DPRA, Keratinosens, h-CLAT que evalúan la capacidad de un compuesto químico de provocar eventos clave para que se produzcan reacciones de sensibilización cutánea, junto con el software QSAR Toolbox constituyen un buen modelo para poder analizar el potencial sensibilizante de antineoplásicos ya que nos han permitido sugerir predicciones de estos dos antineoplásicos que se ven reflejadas y corroboradas en la literatura. Sin embargo, cabe añadir que para asegurar que este modelo genere predicciones robustas y fiables para poder ser utilizado rutinariamente para testar antineoplásicos, es necesario realizar más ensayos.

5. Conclusiones

5. CONCLUSIONES

- Para el fármaco palbociclib por la técnica *in chemico* del Ensayo Directo de Reactividad Peptídica (DPRA), las técnicas *in vitro* Keratinosens y el Test de Activación de la Línea Celular humana (h-CLAT) y la técnica *in silico* QSAR Toolbox DPRA no se ha podido consolidar una predicción firme aunque con la información obtenida por dichas técnicas se puede sugerir un resultado negativo para este fármaco, el cual concordaría con lo observado en la literatura y ensayos clínicos en los que no se reporta que la sensibilización cutánea sea un efecto adverso común.
- La predicción final para el fármaco paclitaxel empleando las técnicas DPRA, Keratinosens, h-CLAT y QSAR Toolbox ha sido positiva, considerándose sensibilizante y coincidiendo con la información derivada de ensayos clínicos de este fármaco donde la sensibilización cutánea se encuentra entre los efectos colaterales comunes.
- La combinación de estas técnicas *in chemico*, *in vitro* e *in silico* muestra un claro potencial para evaluar la capacidad sensibilizante de antineoplásicos, y aunque se deban realizar mas ensayos y analizar exhaustivamente aspectos que puedan ser mejorados para asegurar una predicción lo menos confusa y más fiable posible, se puede concluir que estas técnicas construyen un modelo de predicción para testar la capacidad sensibilizante de futuros antineoplásicos.

6. Referencias bibliográficas

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCIA, F.; ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; SPISNI, E.; TOMASI, V.; TRENTALANCE, A.; VISCA, P.; MARINO, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: Regulation by 17beta-estradiol. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 231-237. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0547>

AHLIN, C.; LUNDGREN, C.; EMBRETSÉN-VARRO, E.; JIRSTRÖM, K.; BLOMQVIST, C.; FJÄLLSKOG, M.-L. (2017). High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Research and Treatment*, 164(3), 667-678. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4294-5>

ANDERS, L.; KE, N.; HYDBRING, P.; CHOI, Y. J.; WIDLUND, H. R.; CHICK, J. M.; ZHAI, H.; VIDAL, M.; GYGI, S. P.; BRAUN, P.; SICINSKI, P. (2011). A systematic screen for cdk4/6 substrates links foxm1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. *Cancer cell*, 20(5), 620-634. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.001>

ANTONOPOULOS, C.; CUMBERBATCH, M.; MEE, J. B.; DEARMAN, R. J.; WEI, X.-Q.; LIEW, F. Y.; KIMBER, I.; GROVES, R. W. (2008). IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(2), 361-367. <https://doi.org/10.1189/jlb.0604352>

BERETTA, G. L.; ZUNINO, F. (2008). Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Topics in Current Chemistry*, 283, 1-19. https://doi.org/10.1007/128_2007_3

BINGHAM, M. (2017). *Skin sensitisation* [Text]. EU Science Hub - European Commission. <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/skin-sensitisation>

BORGÅ, O.; HENRIKSSON, R.; BJERMO, H.; LILIENBERG, E.; HELDRING, N.; LOMAN, N. (2019). Maximum tolerated dose and pharmacokinetics of paclitaxel micellar in patients with recurrent malignant solid tumours: A dose-escalation study. *Advances in Therapy*, 36(5), 1150-1163. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-00909-6>

CAIADO, J.; PICARD, M. (2014). Diagnostic tools for hypersensitivity to platinum drugs and taxanes: Skin testing, specific ige, and mast cell/basophil mediators. *Current Allergy and Asthma Reports*, 14(8), 451. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0451-7>

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M. J.; HERREROS DE TEJADA, A. (2012). Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. *Farmacia Hospitalaria*, 36(3), 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.farma.2011.02.004>

CRISTOFANILLI, M.; TURNER, N. C.; BONDARENKO, I.; RO, J.; IM, S.-A.; MASUDA, N.; COLLEONI, M.; DEMICHELE, A.; LOI, S.; VERMA, S.; IWATA, H.; HARBECK, N.; ZHANG, K.; THEALL, K. P.; JIANG, Y.; BARTLETT, C. H.; KOEHLER, M.; SLAMON, D. (2016). Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): Final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 17(4), 425-439. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00613-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00613-0)

DA SILVA, L.; LAKHANI, S. R. (2010). Pathology of hereditary breast cancer. *Modern Pathology*, 23(2), S46-S51. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.37>

DAGENAIS, G. R.; LEONG, D. P.; RANGARAJAN, S.; LANAS, F.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; GUPTA, R.; DIAZ, R.; AVEZUM, A.; OLIVEIRA, G. B. F.; WIELGOSZ, A.; PARAMBATH, S. R.; MONY, P.; ALHABIB, K. F.; TEMIZHAN, A.; ISMAIL, N.; CHIFAMBA, J.; YEATES, K.; KHATIB, R.; RAHMAN, O.; ... YUSUF, S. (2020). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (Pure): A prospective cohort study. *The Lancet*, 395(10226), 785-794. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32007-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32007-0)

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. (2016). Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. *Journal of Cancer*, 7(10), 1281-1294. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>

DEMICHELE, A.; CLARK, A. S.; TAN, K. S.; HEITJAN, D. F.; GRAMLICH, K.; GALLAGHER, M.; LAL, P.; FELDMAN, M.; ZHANG, P.; COLAMECO, C.; LEWIS, D.; LANGER, M.; GOODMAN, N.; DOMCHEK, S.; GOGINENI, K.; ROSEN, M.; FOX, K.; O'DWYER, P. (2015). Cdk 4/6 inhibitor palbociclib (Pd0332991) in rb+ advanced breast cancer: Phase ii activity, safety, and predictive biomarker assessment. *Clinical Cancer Research*, 21(5), 995-1001. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2258>

ELIE-CAILLE, C.; SEVERIN, F.; HELENIUS, J.; HOWARD, J.; MULLER, D. J.; HYMAN, A. A. (2007). Straight gdp-tubulin protofilaments form in the presence of taxol. *Current Biology*, 17(20), 1765-1770. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.063>

EMA, 2018. *Ibrance* [Text]. Visto el 10 de abril de 2020, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ibrance>

FERLINI, C.; CICCHILLITTI, L.; RASPAGLIO, G.; BARTOLLINO, S.; CIMITAN, S.; BERTUCCI, C.; MOZZETTI, S.; GALLO, D.; PERSICO, M.; FATTORUSSO, C.; CAMPANI, G.; SCAMBIA, G. (2009). Paclitaxel directly binds to bcl-2 and functionally mimics activity of nur77. *Cancer Research*, 69(17), 6906-6914. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0540>

FINLEY, D., CHEN, X.; WALTERS, K. J. (2016). Gates, channels, and switches: Elements of the proteasome machine. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(1), 77-93. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.10.009>

FINN, R. S.; MARTIN, M.; RUGO, H. S.; JONES, S.; IM, S.-A.; GELMON, K.; HARBECK, N.; LIPATOV, O. N.; WALSHE, J. M.; MOULDER, S.; GAUTHIER, E.; LU, D. R.; RANDOLPH, S.; DIÉRAS, V.; SLAMON, D. J. (2016). Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(20), 1925-1936. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607303>

FOLEY, E. A.; KAPOOR, T. M. (2013). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(1), 25-37. <https://doi.org/10.1038/nrm3494>

FRAGOMENI, S. M.; SCIALLIS, A.; JERUSS, J. S. (2018). Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. *Surgical oncology clinics of North America*, 27(1), 95-120. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2017.08.005>

FRANK GERBERICK, G.; RYAN, C. A.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. (2007). Local lymph node assay (Llna) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods*, 41(1), 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.006>

GLOBOCAN, 2018. Visto el 20 de marzo de 2020, de <http://gco.iarc.fr/today/home>

GOEL, S.; DECRISTO, M. J.; WATT, A. C.; BRINJONES, H.; SCENEAY, J.; LI, B. B.; KHAN, N.; UBELLACKER, J. M.; XIE, S.; METZGER-FILHO, O.; HOOG, J.; ELLIS, M. J.; MA, C. X.; RAMM, S.; KROP, I. E.; WINER, E. P.; ROBERTS, T. M.; KIM, H.-J.; MCALLISTER, S. S.; ZHAO, J. J. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, 548(7668), 471-475. <https://doi.org/10.1038/nature23465>

GRIESINGER, C.; CASATI, S.; WORTH, A.; WHELAN, M.; EUROPEAN COMMISSION, JOINT RESEARCH CENTRE; INSTITUTE FOR ENERGY AND TRANSPORT. (2014). *EURL ECVAM recommendation on the KeratinoSensTM assay for skin sensitisation testing*. Publications Office. <http://bookshop.europa.eu/uri?target=EUB:NOTICE:LBNA26427:EN:HTML>

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

HARBECK, N.; GNANT, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, 389(10074), 1134-1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)

HARBECK, N.; PENAULT-LLORCA, F.; CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), 1-31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>

HARDWICK, R. N.; BETTS, C. J.; WHRITENOUR, J.; SURA, R.; THAMSEN, M.; KAUFMAN, E. H.; FABRE, K. (2020). Drug-induced skin toxicity: Gaps in preclinical testing cascade as opportunities for complex *in vitro* models and assays. *Lab on a Chip*, 20(2), 199-214. <https://doi.org/10.1039/C9LC00519F>

HENDRICK, R. E.; BAKER, J. A.; HELVIE, M. A. (2019). Breast cancer deaths averted over 3 decades. *Cancer*, 125(9), 1482-1488. <https://doi.org/10.1002/cncr.31954>

HOKENESS, K.; QIU, L. H.; VEZERIDIS, M.; YAN, B. F.; MEHTA, S.; WAN, Y. S. (2005). IFN-gamma enhances paclitaxel-induced apoptosis that is modulated by activation of caspases 8 and 3 with a concomitant down regulation of the AKT survival pathway in cultured human keratinocytes. *Oncology Reports*, 13(5), 965-969.

INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. (2013). *EURL ECVAM recommendation on the direct peptide reactivity assay (Dpra) for skin sensitisation testing*. Publications Office. <http://dx.publications.europa.eu/10.2788/48229>

INSTITUTE FOR HEALTH AND CONSUMER PROTECTION. (2015). *EURL ECVAM recommendation on the human Cell Line Activation Test (H-clat) for skin sensitisation testing*. Publications Office. <http://dx.publications.europa.eu/10.2788/29986>

IQBAL, N.; IQBAL, N. (2014). Human epidermal growth factor receptor 2 (Her2) in cancers: Overexpression and therapeutic implications. *Molecular Biology International*, 2014, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/852748>

JAVEED, A.; ASHRAF, M.; RIAZ, A.; GHAFUOR, A.; AFZAL, S.; MUKHTAR, M. M. (2009). Paclitaxel and immune system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(4), 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.08.009>

- JORDAN, M. A.; WILSON, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 253-265. <https://doi.org/10.1038/nrc1317>
- KIDD, J. F.; PILKINGTON, M. F.; SCHELL, M. J.; FOGARTY, K. E.; SKEPPER, J. N.; TAYLOR, C. W.; THORN, P. (2002). Paclitaxel affects cytosolic calcium signals by opening the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6504-6510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106802200>
- KIM, Y. N.; KIM, J. Y.; KIM, J. W.; KIM, J. H.; KIM, H. I.; YUNE, S.; CHOI, D.-C.; LEE, B.-J. (2016). The hidden culprit: A case of repeated anaphylaxis to cremophor. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 8(2), 174-177. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.2.174>
- KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; RYAN, C. A.; DEARMAN, R. J. (2011). Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization. *Toxicological Sciences*, 120(Supplement 1), S238-S268. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq346>
- KUEH, H. Y.; MITCHISON, T. J. (2009). Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5943), 960-963. <https://doi.org/10.1126/science.1168823>
- LI, Q.; MA, Z.; LIU, Y.; KAN, X.; WANG, C.; SU, B.; LI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, P.; LUO, Y.; NA, D.; WANG, L.; ZHANG, G.; ZHU, X.; WANG, L. (2016). Low doses of paclitaxel enhance liver metastasis of breast cancer cells in the mouse model. *The FEBS Journal*, 283(15), 2836-2852. <https://doi.org/10.1111/febs.13767>
- LITT, J. Z.; SHEAR, N., H. (2017). *Litt's drug eruption & reaction manual*. 24th Ed. CRC Press. New York. 403 pp.
- LLANOS, S.; MEGIAS, D.; BLANCO-APARICIO, C.; HERNÁNDEZ-ENCINAS, E.; ROVIRA, M.; PIETROCOLA, F.; SERRANO, M. (2019). Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications. *Oncogene*, 38(20), 3886-3902. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0695-8>
- MADEIRA, M.; MATTAR, A.; LOGULLO, Â. F.; SOARES, F. A.; GEBRIM, L. H. (2013). Estrogen receptor alpha/beta ratio and estrogen receptor beta as predictors of endocrine therapy responsiveness—a randomized neoadjuvant trial comparison between anastrozole and tamoxifen for the treatment of postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer*, 13(1), 425. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-425>
- MAKKI, J. (2015). Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8, 23-31. <https://doi.org/10.4137/CPath.S31563>
- MANAVATHI, B.; DEY, O.; GAJULAPALLI, V. N. R.; BHATIA, R. S., BUGIDE, S.; KUMAR, R. (2013). Derailed estrogen signaling and breast cancer: An authentic couple. *Endocrine Reviews*, 34(1), 1-32. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1057>
- MCCORMICK, B.; LOWES, D. A.; COLVIN, L.; TORSNEY, C.; GALLEY, H. F. (2016). MitoVitE, a mitochondria-targeted antioxidant, limits paclitaxel-induced oxidative stress and mitochondrial damage in vitro, and paclitaxel-induced mechanical hypersensitivity in a rat pain model. *British Journal of Anaesthesia*, 117(5), 659-666. <https://doi.org/10.1093/bja/aew309>

- MEKHAIL, T. M.; MARKMAN, M. (2002). Paclitaxel in cancer therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(6), 755-766. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.6.755>
- MIETTINEN, T. P.; PELTIER, J.; HÄRTLOVA, A.; GIERLIŃSKI, M.; JANSEN, V. M.; TROST, M.; BJÖRKLUND, M. (2018). Thermal proteome profiling of breast cancer cells reveals proteasomal activation by CDK4/6 inhibitor palbociclib. *The EMBO Journal*, 37(10), e98359. <https://doi.org/10.15252/embj.201798359>
- MITRA, A.; SEPT, D. (2008). Taxol allosterically alters the dynamics of the tubulin dimer and increases the flexibility of microtubules. *Biophysical Journal*, 95(7), 3252-3258. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.133884>
- MIYAZAWA, M.; ITO, Y.; KOSAKA, N.; NUKADA, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. (2008). Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *The Journal of Toxicological Sciences*, 33(1), 51-59. <https://doi.org/10.2131/jts.33.51>
- MIYAZAWA, M.; ITO, Y.; YOSHIDA, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicology in Vitro*, 21(3), 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.10.005>
- MOMENIMOVAHED, Z.; SALEHINIYA, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 151-164. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S176070>
- MONTERO, J.; LETAI, A. (2018). Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell Death & Differentiation*, 25(1), 56-64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.183>
- MURPHY, C. G.; DICKLER, M. N. (2015). The role of cdk4/6 inhibition in breast cancer. *The Oncologist*, 20(5), 483-490. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0443>
- NATSCH, A.; EMTER, R. (2008). Skin sensitizers induce antioxidant response element dependent genes: Application to the in vitro testing of the sensitization potential of chemicals. *Toxicological Sciences*, 102(1), 110-119. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm259>
- NATSCH, A.; EMTER, R. (2016). Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable keratinosens reporter gene assay. *Alternatives to Laboratory Animals*, 44(5), 443-451. <https://doi.org/10.1177/026119291604400513>
- NATSCH, A.; RYAN, C. A.; FOERTSCH, L.; EMTER, R.; JAWORSKA, J.; GERBERICK, F.; KERN, P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 33(11), 1337-1352. <https://doi.org/10.1002/jat.2868>
- NOGALES, E.; WHITTAKER, M.; MILLIGAN, R. A.; DOWNING, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell*, 96(1), 79-88. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80961-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80961-7)
- OECD, 2012. The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence. OECD Publishing.

OECD, 2018. Test No. 442E: *in vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation. OECD Publishing.

OECD, 2018. Test No.442D: IN VITRO SKIN SENSITISATION ASSAYS ADDRESSING THE AOP KEY EVENT ON KERATINOCYTE ACTIVATION. OECD Publishing.

OECD, 2019. Draft OECD Guideline Defined Approaches for Skin Sensitisation. OECD Publishing.

OECD, 2019. Test No. 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins. OECD Publishing.

OECD, 2020. *The oecd qsar toolbox*. Visto el 25 de abril de 2020, <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>

OH, D.-Y.; BANG, Y.-J. (2020). HER2-targeted therapies—A role beyond breast cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(1), 33-48. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3>

OHL, L.; MOHAUPT, M.; CZELOTH, N.; HINTZEN, G.; KIAFARD, Z.; ZWIRNER, J.; BLANKENSTEIN, T.; HENNING, G.; FÖRSTER, R. (2004). Ccr7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2), 279-288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.014>

OKANO, J.; RUSTGI, A. K. (2001). Paclitaxel induces prolonged activation of the ras/mek/erk pathway independently of activating the programmed cell death machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 19555-19564. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011164200>

PARKINSON, E.; ALEKSIC, M.; CUBBERLEY, R.; KAUR-ATWAL, G.; VISSERS, J. P. C.; SKIPP, P. (2018). Determination of protein haptentation by chemical sensitizers within the complexity of the human skin proteome. *Toxicological Sciences*, 162(2), 429-438. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx265>

PFANNENSTIEL, L. W.; LAM, S. S. K.; EMENS, L. A.; JAFFEE, E. M.; ARMSTRONG, T. D. (2010). Paclitaxel enhances early dendritic cell maturation and function through TLR4 signaling in mice. *Cellular immunology*, 263(1), 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.03.001>

PFIZER, 2016. *La Unión Europea aprueba palbociclib para el tratamiento del cáncer de mama metastásico RE+/HER2-*. Visto el 10 de abril de 2020, https://www.pfizer.es/salud/noticias/union_europea_aprueba_palbociclib_tratamiento_cancer_mama_metastasio_reher2.html

PROTA, A. E.; BARGSTEN, K.; ZURWERRA, D.; FIELD, J. J.; DÍAZ, J. F.; ALTMANN, K.-H.; STEINMETZ, M. O. (2013). Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 587-590. <https://doi.org/10.1126/science.1230582>

ROBERTS, D. W.; APTULA, A. O. (2008). Determinants of skin sensitisation potential. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 28(3), 377-387. <https://doi.org/10.1002/jat.1289>

ROGER, I. (2014). *Estudio de la probabilidad de afectación de ganglios axilares tras el análisis del ganglio centinela mediante el método OSNA en el cáncer de mama*. Trabajo Fin de Grado. Univ. de València. 39pp.

- RYAN, C. A.; KIMBER, I.; BASKETTER, D. A.; PALLARDY, M.; GILDEA, L. A.; GERBERICK, G. F. (2007). Dendritic cells and skin sensitization: Biological roles and uses in hazard identification. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(3), 384-394. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.006>
- SABBAH, M.; COURILLEAU, D.; MESTER, J.; REDEUILH, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: Involvement of a cAMP response-like element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11217-11222. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11217>
- SAKAGUCHI, H.; ASHIKAGA, T.; MIYAZAWA, M.; KOSAKA, N.; ITO, Y.; YONEYAMA, K.; SONO, S.; ITAGAKI, H.; TOYODA, H.; SUZUKI, H. (2009). The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (H-clat). *Cell Biology and Toxicology*, 25(2), 109-126. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9059-9>
- SCHWÖBEL, J.; MADDEN, J.; CRONIN, M. (2011). Application of a chemical reactivity database to predict toxicity for reactive mechanisms. *Journal of Cheminformatics*, 3(Suppl 1), P18. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-S1-P18>
- SHAGUFTA, NULL; AHMAD, I. (2018). Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 515-531. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.056>
- SIBAUD, V.; LEBŒUF, N. R.; ROCHE, H.; BELUM, V. R.; GLADIEFF, L.; DESLANDRES, M.; MONTASTRUC, M.; ECHE, A.; VIGARIOS, E.; DALENC, F.; LACOUTURE, M. E. (2016). Dermatological adverse events with taxane chemotherapy. *European journal of dermatology : EJD*, 26(5), 427-443. <https://doi.org/10.1684/ejd.2016.2833>
- SMITH, I. E.; DOWSETT, M. (2003). Aromatase inhibitors in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 348(24), 2431-2442. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023246>
- STRICKLAND, J.; ZANG, Q.; KLEINSTREUER, N.; PARIS, M.; LEHMANN, D. M.; CHOKSI, N.; MATHESON, J.; JACOBS, A.; LOWIT, A.; ALLEN, D.; CASEY, W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *Journal of applied toxicology : JAT*, 36(9), 1150-1162. <https://doi.org/10.1002/jat.3281>
- TAMURA, K.; MUKAI, H.; NAITO, Y.; YONEMORI, K.; KODAIRA, M.; TANABE, Y.; YAMAMOTO, N.; OSERA, S.; SASAKI, M.; MORI, Y.; HASHIGAKI, S.; NAGASAWA, T.; UMEYAMA, Y.; YOSHINO, T. (2016). Phase I study of palbociclib, a cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, in Japanese patients. *Cancer Science*, 107(6), 755-763. <https://doi.org/10.1111/cas.12932>
- URBISCH, D.; MEHLING, A.; GUTH, K.; RAMIREZ, T.; HONARVAR, N.; KOLLE, S.; LANDSIEDEL, R.; JAWORSKA, J.; KERN, P. S.; GERBERICK, F.; NATSCH, A.; EMTER, R.; ASHIKAGA, T.; MIYAZAWA, M.; SAKAGUCHI, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 71(2), 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.008>
- VOCANSON, M.; HENNINO, A.; ROZIÈRES, A.; POYET, G.; NICOLAS, J.-F. (2009). Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis: Pathophysiology of contact dermatitis. *Allergy*, 64(12), 1699-1714. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x>

WANG, H.; NICOLAY, B. N.; CHICK, J. M.; GAO, X.; GENG, Y.; REN, H.; GAO, H.; YANG, G.; WILLIAMS, J. A.; SUSKI, J. M.; KEIBLER, M. A.; SICINSKA, E.; GERDEMANN, U.; HAINING, W. N.; ROBERTS, T. M.; POLYAK, K.; GYGI, S. P.; DYSON, N. J.; SICINSKI, P. (2017). The metabolic function of cyclin D3–CDK6 kinase in cancer cell survival. *Nature*, *546*(7658), 426-430. <https://doi.org/10.1038/nature22797>

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, *93*(9), 2325-2327. <https://doi.org/10.1021/ja00738a045>

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: Prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(4), R245-R262. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0136>

WHO, 2020. *Breast cancer*. Visto el 20 de marzo de 2020, <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>

XU, H.; YU, S.; LIU, Q.; YUAN, X.; MANI, S.; PESTELL, R. G.; WU, K. (2017). Recent advances of highly selective CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, *10*(1), 97. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0467-2>

ZASADIL, L. M.; ANDERSEN, K. A.; YEUM, D.; ROCQUE, G. B.; WILKE, L. G.; TEVAARWERK, A. J.; RAINES, R. T.; BURKARD, M. E.; WEAVER, B. A. (2014). Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Science translational medicine*, *6*(229), 229ra43. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007965>

ZHANG, D.; YANG, R.; WANG, S.; DONG, Z. (2014). Paclitaxel: New uses for an old drug. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 279-284. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S56801>