



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## ETSIAMN

Grado en Biotecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

# **Análisis del potencial sensibilizante de bevacizumab y sunitinib mediante técnicas *in chemico e in vitro.***

Alumno: Samuel Roselló Andrés

Tutora UPV: Prof. Dra. Patricia Almudéver Folch

Tutores externos: Dr. Julio Cortijo Gimeno; Dña. Pilar Ribera Alta

València, julio 2020

**Título:** Análisis del potencial sensibilizante de bevacizumab y sunitinib mediante técnicas *in chemico* e *in vitro*.

**Resumen:**

La dermatitis de contacto alérgica (DCA) es la manifestación clínica ante la exposición a un agente sensibilizante. Este proceso de sensibilización cutánea comprende una serie de eventos clave que se conocen bien y que están recogidos en un *Adverse Outcome Pathway* (AOP) por parte de la OECD. Tradicionalmente, el estudio de sensibilización cutánea se llevaba a cabo en animales. Como resultado de la prohibición del uso de animales en experimentación para cosméticos, se desarrollaron una serie de técnicas *in chemico* e *in vitro* que permiten valorar tres de los cuatro eventos claves. Estas son: *Direct Peptide Reactivity Assay* (DPRA), una técnica *in chemico* que se enfoca en el primero de los eventos, es decir, la interacción covalente del hapteno con proteínas de la piel; KeratinoSens™, un ensayo *in vitro* dirigido al segundo evento, la activación de los queratinocitos de la piel, y, por último, el ensayo *human Cell Line Activation test* (h-CLAT) que apunta al tercer evento clave, la activación de las células dendríticas y su expresión de marcadores de superficie específicos. Se ha demostrado que sunitinib y bevacizumab, dos antineoplásicos de amplio uso en terapias antiangiogénicas contra el cáncer, provocan reacciones de hipersensibilidad en los pacientes. Sunitinib es un inhibidor de múltiples receptores quinasa, entre los que se encuentran los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular 1, 2 y 3 (VEGFR 1, 2, 3), implicados en la neoangiogénesis y la supervivencia tumoral. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-VEGF, uniéndose de forma selectiva a todas las isoformas de VEGF y bloqueando su función. Así pues, este trabajo trata de estudiar mediante dichas técnicas el efecto sensibilizante de sunitinib y bevacizumab, y evaluar la incorporación de estas técnicas, como alternativa a los animales, en la fase preclínica de los candidatos a fármacos.

Allergic contact dermatitis is the clinical manifestation of exposure to a sensitizing agent. This skin sensitization process includes four key events that are well-known and collected in an Adverse Outcome Pathway (AOP) by the OECD. Traditionally, the skin sensitization study was carried out in animals. As a result of the prohibition of the use of animals in cosmetic experimentation, a series of techniques were developed *in chemico* and *in vitro* to evaluate three of the four key events. These are: Direct peptide reactivity assay (DPRA), an *in chemico* technique that focuses on the first of events, i.e. the covalent interaction of the hapten with skin proteins; KeratinoSens™, an *in vitro* assay targeting the second event, the activation of skin keratinocytes, and finally the human cell line activation test (h-CLAT) that points to the third key event, the activation of dendritic cells and their expression of specific cell surface markers. It has been proved that sunitinib and bevacizumab, two antineoplastics widely used in antiangiogenic therapies against cancer, produce hypersensitivity reactions in patients. Sunitinib is a multi-receiver kinase inhibitor, including vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 (VEGFR 1, 2, 3), involved in neoangiogenesis and tumour survival. Bevacizumab is an anti-VEGF humanized monoclonal antibody, which selectively binds to all VEGF isoforms and blocks its function. Therefore, this work tries to study through these techniques the sensitizing effect of sunitinib and bevacizumab, and to assess the incorporation of this techniques, as an alternative of using animals, in preclinical stages of antineoplastics.

**Palabras clave:** sensibilización cutánea, DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT, sunitinib, bevacizumab.

**Key words:** skin sensitisation, DPRA, KeratinoSens™, h-CLAT, sunitinib, bevacizumab.

**Autor del TFG:** Samuel Roselló Andrés

**Localidad y fecha:** Valencia, julio 2020

**Tutor UPV:** Dra. Patricia Almudéver Folch

**Tutores externos:** Dr. Julio Cortijo Gimeno, Dña. Pilar Ribera Alba

**Agradecimientos:**

A Julio Cortijo, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación e introducirme así en el apasionante mundo de la investigación.

A Pilar, por todo el apoyo, consejos y motivación y por todo el aprendizaje no solo científico, sino también personal.

A todo el equipo, porque habéis hecho todo más fácil.

A Patricia Almudéver, por su atención, esfuerzo y dedicación.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sensibilización cutánea .....	1
1.2. Antecedentes de la evaluación de la sensibilización cutánea.....	3
1.3. Técnicas alternativas a la experimentación animal .....	4
1.3.1. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA).....	5
1.3.2. KeratinoSens™ .....	5
1.3.3. h-CLAT .....	7
1.4. Angiogénesis tumoral.....	7
1.4.1. VEGF .....	8
1.4.2. VEGFR .....	8
1.4.3. VEGF en el microambiente tumoral .....	10
1.4.4. Inhibidores de la angiogénesis como estrategia contra el cáncer .....	11
1.5. Sunitinib .....	11
1.5.1. Mecanismo de acción.....	12
1.5.2. Uso terapéutico.....	13
1.5.3. Estudios de toxicidad cutánea.....	13
1.6. Bevacizumab .....	14
1.6.1. Mecanismo de acción.....	14
1.6.2. Uso terapéutico.....	15
1.6.3. Estudios de toxicidad cutánea.....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. Fármacos .....	18
3.2. Cultivos celulares.....	18
3.2.1. Cultivo rutinario línea celular KeratinoSens.....	18
3.2.2. Cultivo rutinario línea celular THP-1 .....	18
3.3. DPRA.....	19
3.4. KeratinoSens™ .....	20
3.5. h-CLAT .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
4.1. Sunitinib .....	25
4.2. Bevacizumab .....	27
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>33</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase de inducción del proceso fisiopatológico de la DCA .....	2
Figura 2. Ruta de activación de la vía Nrf2-Keap1-ARE .....	6
Figura 3. Receptores VEGFR y sus respectivos ligandos. ....	9
Figura 4. Funciones de VEGF en el ambiente tumoral. ....	10
Figura 5. Estructura química de sunitinib.....	12
Figura 6. Esquema de los mecanismos de acción de bevacizumab y sunitinib.....	15
Figura 7. Análisis de la disminución peptídica de la cisteína tras la incubación sunitinib .....	25
Figura 8. Efectos de sunitinib sobre la línea celular KeratinoSens.....	26
Figura 9. Efectos de sunitinib sobre la línea celular de monocitos THP-1 .....	27
Figura 10. Efectos de bevacizumab sobre la línea celular KeratinoSens .....	27
Figura 11. Efectos de bevacizumab sobre la línea celular de monocitos THP-1 .....	28

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fármacos utilizados y sus concentraciones.....	18
Tabla 2. Modelo de predicción de DPRA.....	20

## ABREVIATURAS

- **AOP:** Adverse Outcome Pathway
- **ARE:** elementos de respuesta antioxidante
- **CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad
- **CSFR1:** receptor del factor estimulante de colonias 1
- **c-kit:** receptor del factor de células madre
- **DCA:** dermatitis de contacto alérgica
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNCB:** 2,4-dinitroclorobenceno
- **DPBS:** Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
- **DPM:** desintegraciones por minuto
- **DPRA:** Direct Peptide Reactivity Assay
- **ECVAM:** European Centre for the Validation of Alternative Methods
- **EGF:** factor de crecimiento epidérmico
- **eNOS:** sintasa de óxido nítrico endotelial
- **EURL:** European Union Reference Laboratory
- **FBS:** Fetal Bovine Serum
- **FCS:** Fetal Calf Serum
- **FDA:** Food and Drug Administration
- **FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos
- **FLT3:** receptor tirosina quinasa 3 similar a FMS
- **GBM:** glioblastoma
- **GIST:** tumor del estroma gastrointestinal
- **GPMT:** Guinea Pig Maximisation Test
- **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia
- **h-CLAT:** human Cell Line Activation Test
- **IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1
- **KGF:** factor de crecimiento para queratinocitos
- **LLNA:** Local Lymph Node Assay
- **LNPA:** Lymph Node Proliferation Assay
- **mCRC:** cáncer colorrectal metastásico
- **MFI:** media geométrica de la intensidad de fluorescencia

- **mRCC:** cáncer renal metastásico
- **mTOR:** diana de rapamicina en mamíferos
- **NSCLC:** cáncer de pulmón no microcítico de células no pequeñas avanzado
- **NRP:** neuropilina
- **OECD:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
- **PDGFR:** receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **PI:** yoduro de propidio
- **PI3K:** fosfatidilinositol 3-quinasa
- **PKC:** proteína quinasa C
- **PLC-γ:** fosfolipasa C gamma
- **PLGF:** factor de crecimiento placentario
- **pNET:** tumor neuroendocrino pancreático
- **RCC:** carcinoma de células renales
- **RFI:** intensidad de fluorescencia relativa
- **RTK:** receptores tirosina quinasa
- **TCR:** receptor clonotípico de células T
- **TGF:** factor de crecimiento transformante
- **THP-1:** línea celular humana de monocitos derivadas de leucemia
- **TKI:** inhibidores de receptores tirosina quinasa
- **TSP-1:** trombospondina 1
- **VEGF:** factor de crecimiento endotelial vascular
- **VEGFR:** receptor del factor de crecimiento endotelial vascular



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Sensibilización cutánea

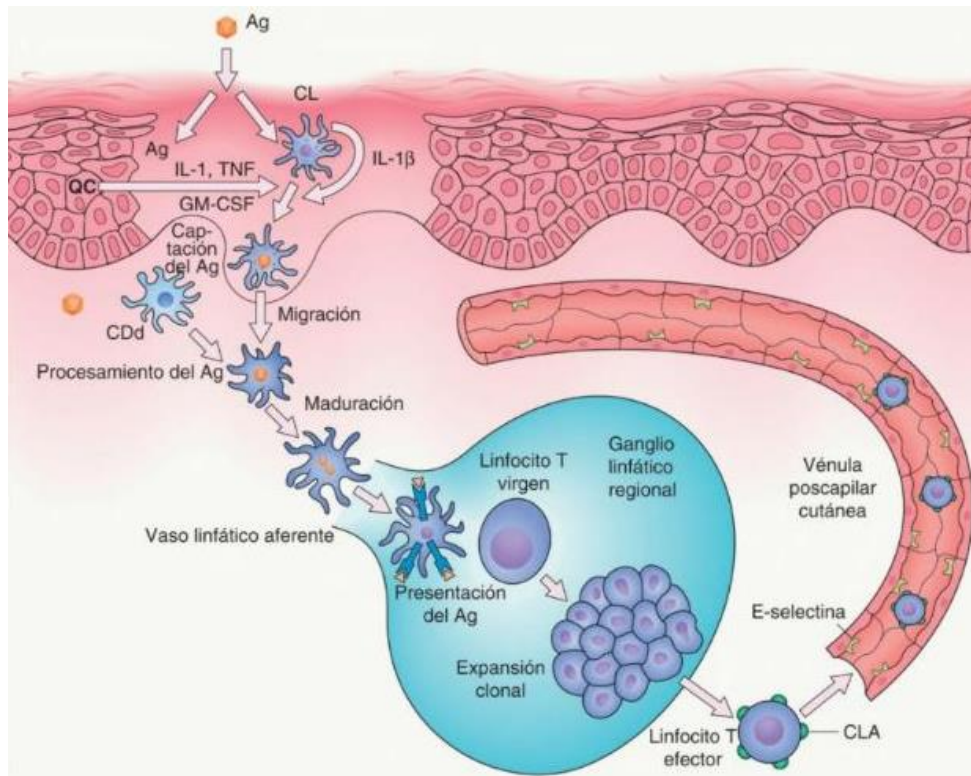
La dermatitis de contacto alérgica (DCA) es la manifestación clínica de la respuesta del sistema inmune adaptativo a la exposición a un agente sensibilizante. Según la clasificación de Gell y Coombs, representa una reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV y se caracteriza por el desarrollo de lesiones de eczema agudo o crónico. A diferencia de los otros tipos de sensibilidad, la de tipo IV no es mediada por anticuerpos, sino por células inmunitarias, más concretamente por linfocitos T (Strickland et al., 2016).

La DCA es de origen exógeno y engloba varios tipos aparte de la propia DCA en sí, que es la más frecuente, como, por ejemplo, la dermatitis de contacto alérgica aerotransportada, la dermatitis de contacto fotoalérgica o la dermatitis de contacto alérgica inducida por vía sistémica. Más concretamente, en esta última la manera en que se expone el alérgeno, no es necesariamente por vía tópica, sino que puede ser por vía oral, intravenosa, inhalada o intramuscular (Aquino y Rosner, 2019). Encontramos una gran diversidad de metales, como el níquel, el mercurio o el cobalto, así como numerosos fármacos que pueden provocar dicha dermatitis (Serra y Puig, 2011).

En la DCA, la sustancia implicada es un hapteno, es decir, una sustancia química de bajo peso molecular que no es capaz por sí misma de inducir una reacción inmunológica, y, por tanto, tampoco una acción sensibilizante. Para ser un agente sensibilizante, ha de unirse a proteínas epidérmicas, creando un complejo hapteno-proteína (Tennstedt et al., 2019).

Como en todas las reacciones alérgicas, podemos distinguir dos etapas en la fisiopatología de la DCA: inducción y elicitación (Strickland et al., 2016).

La primera, la fase aferente o de inducción (Figura 1), consiste en la inducción de memoria inmunológica especializada posterior a la exposición inicial con el alérgeno, es decir, la sensibilización en sí. Empieza con el contacto de un hapteno con la piel, lo que lleva a la producción en los nódulos linfáticos de células T específicas para el reconocimiento del hapteno. La exposición al alérgeno, estimula la producción de citoquinas por parte de los queratinocitos, de las células de Langerhans y de otras células presentes en la piel. Estas citocinas inflamatorias hacen que las células dendríticas de la piel, mayoritariamente células de Langerhans, pasen de un estado "latente" a uno "activado" y que de esta manera capten los haptenos y los procesen como péptidos haptinizados, que son expresados en la superficie celular formando parte del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (CMHI y CMHII). Finalmente, las células presentadoras de antígenos migran al ganglio linfático local y presentan el antígeno a los linfocitos T vírgenes, que presentan el receptor clonotípico de células T (TCR) específico, dando lugar a su activación. Esto provoca su expansión clonal y su diferenciación en efectores. A diferencia de otras hipersensibilidades de respuesta tardía, mediadas en su mayoría por linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las células efectoras que predominan en este caso son los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Estas células efectoras entran en recirculación y migran de vuelta a la piel, esperando encontrarse nuevamente con el antígeno en un futuro (Bologna et al., 2018).



**Figura 1. Fase de inducción del proceso fisiopatológico de la dermatitis de contacto alérgica (DCA).** El contacto con la piel de un antígeno, provoca la liberación de citocinas por parte de los queratinocitos (QC) y las células de Langerhans (CL). Esto activa a las CL que procesan y expresan el antígeno, migrando a continuación a los ganglios linfáticos, donde se lo presentan a los linfocitos T. Tras su expansión clonal y su diferenciación en linfocitos efectoros regresan a la piel, esperando una nueva exposición.

En segundo lugar, la elicitación o fase eferente, es la respuesta alérgica que genera la manifestación clínica cutánea en aquellos individuos ya sensibilizados. Cuando se vuelve a entrar en contacto con el hapteno, de nuevo los queratinocitos y las células de Langerhans liberan citocinas, lo que induce la expresión de moléculas de adhesión y la activación de las células endoteliales. Esto provoca la atracción de los leucocitos, entre los que se encuentran los linfocitos T efectoros que se activan en cuanto las células dendríticas o los macrófagos infiltrantes les presentan el antígeno. Esta activación del linfocito T, que tiene especificidad antigénica, estimula la liberación de citocinas por su parte. Esto, a su vez, atrae a otras células inflamatorias, como pueden ser macrófagos y granulocitos, que son los responsables de las manifestaciones clínicas de la DCA, tales como enrojecimiento, picor y quemazón en la piel (Bologna et al., 2018).

Una AOP (por sus siglas en inglés *Adverse Outcome Pathway*) es un modelo que establece la secuencia de eventos moleculares o celulares que desencadenan en un efecto adverso cuando se produce una exposición a una sustancia (Vinken, 2013). Esta herramienta permite mejorar, estructurar y relacionar el conocimiento sobre los mecanismos de toxicidad y sus interacciones en el organismo, así como favorecer la implantación de nuevos estudios celulares o bioquímicos que evalúen dicha toxicidad (Kleinstreuer et al., 2016). De este modo, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD), ha recopilado el conocimiento sobre los eventos químicos y biológicos relacionados con la sensibilidad cutánea con el fin de facilitar

estudios toxicológicos de posibles compuestos sensibilizantes, permitiendo focalizarse en cada uno de los eventos clave (Strickland et al., 2016).

Así pues, la AOP de la sensibilización cutánea está descrita en el documento publicado por la OECD, en el que se identifican los cuatro eventos clave (OECD, 2017):

- 1) El primer evento clave es la unión covalente del hapteno, o de sus derivados reactivos, con proteínas endógenas de la piel. Esta interacción se produce en residuos de cisteína y/o lisina. El resultado de esta unión es un complejo hapteno-proteína que es estable y queda activado, permitiendo su reconocimiento por parte de las células dendríticas.
- 2) El segundo evento clave es la activación de los queratinocitos de la piel, incluyendo tanto las respuestas inflamatorias, como la expresión de genes asociada a vías citoprotectoras, en particular la ruta dependiente del elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (antioxidant/electrophile response element; ARE/EpRE).
- 3) El tercer evento clave se trata, tanto de la activación o maduración de las células dendríticas, células de Langerhans, como de su movilización.
- 4) El último evento clave es la presentación del antígeno por parte de las células dendríticas a los linfocitos T vírgenes, así como su diferenciación y proliferación en linfocitos T específicos de antígeno.

## **1.2. Antecedentes de la evaluación de la sensibilización cutánea**

Tradicionalmente, los estudios realizados sobre la sensibilización cutánea se han realizado empleando modelos animales, siendo la cobaya y el ratón los más utilizados. Cabe destacar pues el *Magnusson Kligman Guinea Pig Maximisation Test* (GPMT), descrito y desarrollado por Magnusson y Kligman en 1969, en el que se evalúan las dos fases de la sensibilización cutánea en cobaya (Alejandro et al., 2014), y el *Local Lymph Node Assay* (LLNA), dónde se estudia exclusivamente la fase de inducción en ratón (Frank Gerberick et al., 2007).

El GPMT consiste en aplicar el compuesto a testar mediante inyecciones intradérmicas junto con adyuvante de Freund. Pasada una semana, se rasura la misma área de inyección, se realiza una aplicación tópica directa del producto y se cubre con un vendaje oclusivo durante 48 horas. Este paso se correspondería con la fase de inducción, en la que se desarrollará la respuesta del sistema inmune durante al menos de 10 a 14 días (Magnusson y Kligman, 1969). La siguiente fase, que se corresponde con la elicitación, se evalúa pasado este tiempo, mediante la aplicación de nuevo del producto que se está testando. Se mantiene durante 24 horas y al retirarse se procede a la valoración del estado de la piel, observándose la aparición o no de eritemas o edemas de varios grados a las 24 y 48 horas (OECD, 1992).

Por otro lado, y debido a que se ha investigado más y se conoce mejor el sistema inmune del ratón, este animal, como se ha mencionado anteriormente, también se ha usado como modelo para el estudio de la sensibilización cutánea destacando el LLNA (OECD, 1992). Aprobado originalmente en 2002 y sujeto a varias actualizaciones desde entonces, proporciona notables ventajas con respecto al GPMT, desde el punto de vista del bienestar animal y, si bien no elimina el uso de animales, sí que reduce el número de animales requeridos (OECD, 2010).

El ensayo LLNA se basa en los eventos inmunológicos que tienen lugar durante la fase de inducción de la sensibilización cutánea, en concreto, estudia la proliferación linfocitaria en los nódulos linfáticos locales. El procedimiento consiste en aplicar una disolución del compuesto a

testar sobre el dorso de cada oreja del animal, una vez al día durante los tres primeros días. Al sexto día se les inyecta a los ratones, por vía intravenosa a través de la cola, una solución que contiene timidina tritiada. A las 5 horas, se sacrifican los animales, extirpando los nódulos linfáticos auriculares de cada oreja del ratón. Se procede a extraer el ADN de las células y se cuentan las desintegraciones por minuto o DPM, para así poder cuantificar la timina marcada que habrán incorporado las células en división. Es de esta manera como se puede evaluar el incremento leucocitario en el ganglio linfático ligado a la fase de inducción como consecuencia de la exposición a una sustancia sensibilizante (OECD, 2010).

Una de las ventajas de dicho estudio es que proporciona información cuantitativa para una valoración dosis-respuesta. Sin embargo, hay que tener en cuenta sus limitaciones, ya que, en caso de un resultado negativo, este debe ser comprobado usando el GPMT. Esto no ocurre así con un resultado positivo, que sí que sirve para catalogar una sustancia como sensibilizante (OECD, 2010).

### **1.3. Técnicas alternativas a la experimentación animal**

Hace 44 años que la Unión Europea firmaba la Convención Europea para la Protección de Animales en explotaciones ganaderas. Desde entonces, gracias a numerosas medidas, se ha convertido en una de las potencias mundiales que más ha avanzado en el terreno de la ética animal, tratando de garantizar en todo momento su bienestar (Munoz, 2019).

Más concretamente, en 2013 entró en vigor la prohibición de ensayos en animales para testar productos cosméticos y la comercialización de aquellos cuya producción haya requerido la experimentación animal. Esta fue la culminación de una eliminación progresiva del uso de modelos *in vivo*, en la que se llevaba años trabajando. En 2003, se publicó la Directiva 2003/15/CE que ya prohibía en sus disposiciones la experimentación con animales para los productos cosméticos acabados (UE, 2003). Más tarde, en marzo de 2009, mediante el Reglamento (CE) 1223/2009 se amplía la prohibición a aquellos productos cosméticos cuyos ingredientes o combinaciones de estos hayan sido testados en animales, así como la comercialización de aquellos productos que contengan ingredientes que hayan requerido el uso de animales (UE, 2009).

La posición actual de Europa, el mayor mercado de cosméticos mundial, sigue siendo la seguridad para la salud de los consumidores teniendo en cuenta el bienestar animal, y por consiguiente su objetivo actual es conseguir una supresión a nivel internacional de la experimentación animal en la industria cosmética (UE, 2018).

Gracias a este marco ético y normativo en el que nos encontramos, donde prima la calidad de vida de los animales sin descuidar la salud humana; y al progreso del conocimiento sobre el proceso de sensibilización cutánea, se han desarrollado técnicas alternativas a los modelos *in vivo*. Estas técnicas han sido aprobadas por la OECD y forman parte de la estrategia conjunta del EURL-ECVAM (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing) para la sustitución de los ensayos con animales. Así pues, los métodos recomendados por el EURL-ECVAM para la evaluación del potencial sensibilizante de un compuesto son DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*), KeratinoSens™ y h-CLAT (*human Cell Line Activation Test*), cada uno de los cuales se dirige a un evento clave del AOP de la sensibilización. Un método por sí mismo es complicado que reemplace a los modelos animales, por eso, se trabaja con varias técnicas

conjuntamente (Casati et al., 2013). Cabe destacar también, que las tres técnicas fueron validadas y puestas a punto en nuestro laboratorio (Fombuena, 2019).

### **1.3.1. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)**

El DPRA es una técnica *in chemico* que mide el primer evento clave. Este método cuantifica la concentración del péptido lisina o cisteína que queda sin unir, después de 24 horas de incubación con el compuesto a testar. Esta cuantificación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con elución en gradiente y un detector UV (OECD, 2019).

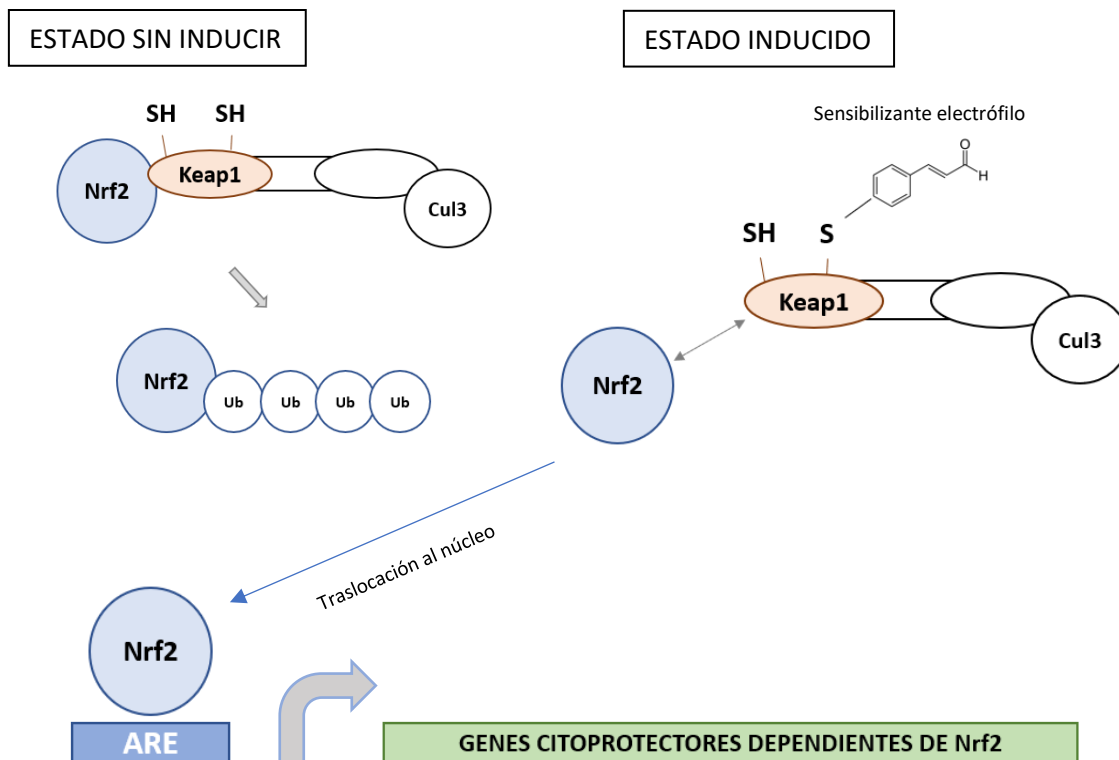
Por tanto, esta técnica evalúa el proceso de haptención, en el que los haptenos electrofílicos de bajo peso molecular forman complejos hapteno-proteína al unirse de manera covalente a proteínas transportadoras de la piel, dotando de inmunogenicidad a dicho complejo, que se vuelve antigénico. En este punto, cabe resaltar una de las limitaciones de esta técnica, ya que se trata de una técnica *in chemico* que no implica el uso de células y, por tanto, carece de un sistema metabólico. Por esto, no se pueden detectar aquellos haptenos que necesitan una bioactivación enzimática (prohaptenos). En cambio, sí que es posible medir aquellos haptenos que se vuelven sensibilizantes tras una activación abiótica (prehaptenos) (OECD, 2019).

Tal y como refleja la OECD (2019), el método DPRA ha sido evaluado y validado por el EURL ECVAM, mostrando unos niveles de reproducibilidad de entre el 80-85% y una precisión para diferenciar los compuestos sensibilizantes de aquellos que no lo son del 80%, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 77%.

### **1.3.2. KeratinoSens™**

Esta técnica *in vitro* tiene como objetivo evaluar el segundo evento clave de la sensibilización cutánea. En concreto, KeratinoSens™ se trata de un ensayo que permite determinar, mediante la enzima luciferasa, la respuesta de activación mediada por Nrf2 de los genes dependientes de ARE (OECD, 2018).

Como podemos observar en la Figura 2, bajo condiciones normales, el factor transcripcional Nrf2 se encuentra unido a Keap1 en el citoplasma celular, facilitando así su ubiquitinación mediada por Cul3, su transporte al proteasoma, y, por último, su degradación. Keap1 es una proteína que actúa como sensor, con una alta cantidad de residuos de cisteína reactivos. El contacto con pequeñas moléculas electrófilas modifica covalentemente los residuos reactivos de cisteína de Keap1, lo que conlleva su disociación de Nrf2. Esto produce una acumulación de Nrf2 en el citoplasma y su translocación al núcleo, donde induce la activación de aquellos genes que contienen ARE en sus promotores, principalmente genes que codifican enzimas de la fase II de detoxificación (Natsch, 2010).



**Figura 2. Ruta de activación de la vía Nrf2-Keap1-ARE.** En condiciones normales, Nrf2 y Keap1 se encuentran unidos en el citoplasma celular, lo que favorece la ubiquitinación de Nrf2 mediada por Cul3 y su posterior degradación proteolítica. Sin embargo, la unión de un sensibilizante electrófilo a los residuos reactivos de cisteína ocasiona la disociación del complejo Keap1-Nrf2, translocándose este último al núcleo y ejerciendo su función de factor transcripcional.

El método KeratinoSens™ utiliza una línea celular adherente e inmortalizada derivada de los queratinocitos humanos. Se trata de una línea celular que ha sido transfectada con el gen reportero de la luciferasa, que se encuentra bajo el control transcripcional de un promotor que contiene el elemento ARE, que también controla el gen humano de respuesta antioxidante AKR1C2. Así pues, esto nos permite medir cuantitativamente la inducción del gen de la luciferasa, lo que muestra la actividad del factor nuclear Nrf2 consecuencia de la exposición a compuestos electrofílicos sensibilizantes (OECD, 2018).

De forma paralela a KeratinoSens™, se realizan mediciones de citotoxicidad mediante un ensayo MTT con el objetivo de asegurarse que la inducción de la luciferasa tiene lugar a concentraciones subcitotóxicas.

Esta técnica también ha sido evaluada y validada por el EURL ECVAM, y ha demostrado ser transferible entre laboratorios, con una reproducibilidad del 85%. Tiene la capacidad de discriminar un compuesto sensibilizante de uno no sensibilizante, con una precisión del 77%, una sensibilidad del 78% y una especificidad del 76%, en comparación con el ensayo LLNA (OECD, 2018).

### 1.3.3. h-CLAT

Este ensayo *in vitro* aborda el tercer evento clave de la sensibilización cutánea, es decir, el cambio de expresión de marcadores de superficie celulares asociado a la activación de las células dendríticas y de los monocitos, especialmente de los marcadores de membrana CD54 y CD86 (OECD, 2018)

Se ha demostrado que, en contacto con compuestos químicos sensibilizantes, las células dendríticas aumentan la expresión en su superficie de CD54 y CD86, como parte de su proceso de activación y maduración tras haber entrado en contacto con un hapteno, que concluye con la presentación antigénica a los linfocitos T (Aiba et al., 1997).

De esta manera, el ensayo h-CLAT permite cuantificar estos cambios de expresión de marcadores de superficie (CD54, CD86) en una línea celular humana de monocitos derivadas de leucemia o THP-1. Estos cambios se miden, tras 24 horas de exposición con el compuesto a testar, mediante citometría de flujo usando anticuerpos que llevan unidos fluorocromos. De manera adicional se lleva a cabo una medida de la citotoxicidad, para asegurarse que el proceso de cambio de expresión de los marcadores ocurre en condiciones subcitotóxicas (OECD, 2018).

Como en las técnicas anteriores, el EURL ECVAM se ha encargado de llevar a cabo los estudios de validación de la técnica, demostrando ser una técnica transferible entre laboratorios con un nivel de reproducibilidad de entorno al 80%. Además, ha demostrado ser una técnica capaz de discriminar los compuestos en sensibilizantes o no sensibilizantes, con una precisión del 85%, una sensibilidad del 93% y una especificidad del 66%, si se compara con el LLNA (OECD, 2018).

### 1.4. Angiogénesis tumoral

Como ocurre con los tejidos sanos, los tumores necesitan un aporte continuo de nutrientes y oxígeno, así como un sistema para deshacerse de los desechos metabólicos y del dióxido de carbono. La angiogénesis tumoral, es decir, la proliferación asociada al tumor de nuevos vasos sanguíneos, cubre estas necesidades del tumor (Hanahan y Weinberg, 2011).

Durante el proceso de la embriogénesis, la formación de vasos sanguíneos se produce mediante dos procesos consecutivos: vasculogénesis en primer lugar, en el que se forman los vasos sanguíneos a partir de progenitores endoteliales; seguido de la angiogénesis, donde se desarrollan nuevos vasos a partir de los existentes. En adultos, únicamente se forman nuevos vasos sanguíneos a través de la angiogénesis, y es un proceso que normalmente se encuentra inactivo, salvo en procesos fisiológicos, tales como la curación de heridas, o en el ciclo reproductivo femenino. Sin embargo, durante el proceso de angiogénesis del tumor, el “interruptor angiogénico” se activa y permanece así, ocasionando el surgimiento continuo de nuevos vasos sanguíneos, favoreciendo así al sostenimiento y crecimiento del tumor (Hanahan y Folkman, 1996).

El tumor necesita de este proceso para crecer y poder superar el tamaño de los 2 mm de diámetro, y para establecer, mediante la síntesis y secreción de factores angiogénicos, una red vascular alrededor del tejido huésped, paso previo requerido para la progresión y la metástasis (Talmadge y Fidler, 2010).

Se ha demostrado que este cambio que favorece la angiogénesis se rige por moléculas que o bien inducen o bien inhiben el proceso de neovascularización. Generalmente se trata de

proteínas de señalización que actúan como ligandos de receptores de membrana -tanto estimuladores como inhibidores- de las células del endotelio vascular. Un ejemplo representativo de cada uno sería, el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA), que promueve la angiogénesis, y la trombospondina 1 (TSP-1), que la reprime (Baeriswyl y Christofori, 2009).

#### 1.4.1. VEGF

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno de las células endoteliales con capacidad para inducir angiogénesis fisiológica y patológica. Se trata de una familia génica que incluye varios factores: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y el factor de crecimiento placentario (PLGF). Todos estos difieren entre sí por su función biológica, la especificidad por los receptores y por sus perfiles de expresión. El miembro más característico de esta familia y en el que se centra este trabajo debido a su rol clave en la angiogénesis es VEGFA (Ferrara et al., 2003).

VEGFA, conocido también como VEGF, es una proteína homodimérica que presenta diversas isoformas (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>) como consecuencia de las distintas variantes en el *splicing* alternativo y que también se diferencian por su función, viniendo determinada esta por una mayor o menor afinidad por la heparina, de manera que presentan propiedades de unión a la matriz extracelular o de difusividad, respectivamente (Apte et al., 2019).

El gen que codifica *VEGFA* es exclusivo en cuanto a su insuficiencia haploide, es decir, con que una sola copia del gen sea deficiente, el embrión mutante resultante parece durante la embriogénesis temprana, debido a que se produce una maduración incompleta que resulta en una disfunción del sistema circulatorio. Esto revela la importancia de VEGF y de su concentración local en el tejido, que se encuentra regulada de manera muy ajustada durante la embriogénesis, ya que la mitad de la cantidad de la proteína VEGFA no es suficiente para formar por completo el sistema circulatorio en el cuerpo (Ferrara y Kerbel, 2005).

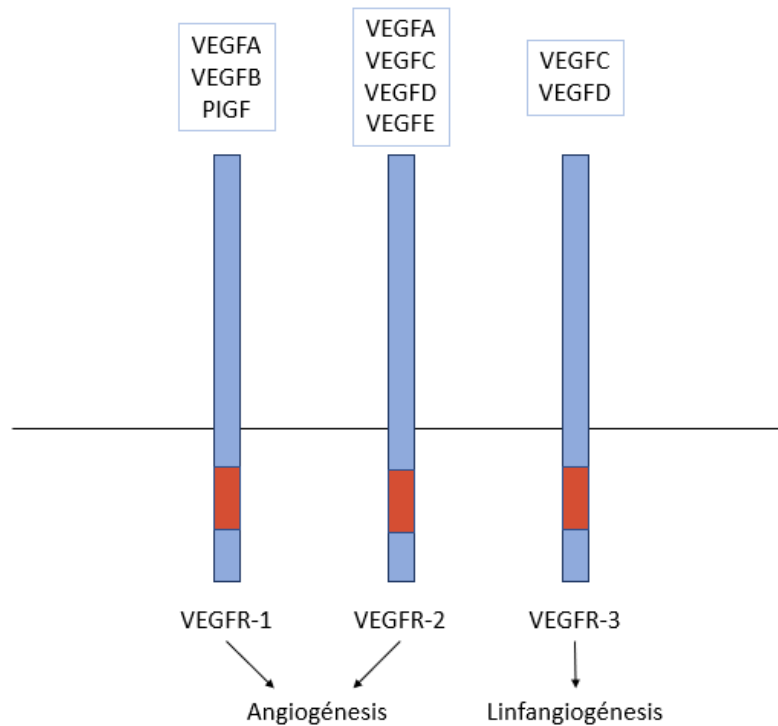
#### 1.4.2. VEGFR

Los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) pertenecen al conjunto de receptores tirosina quinasa (RTK). Encontramos tres subtipos mayoritarios de estos receptores: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) y VEGFR-3 (Flt-4) (Shibuya, 2011). La estructura básica de estos consiste en un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, estructura similar a la de otros miembros de la familia RTK, como el receptor de PDGF o de FGF. En el caso de los VEGFR, estos contienen un dominio extracelular de aproximadamente 750 aminoácidos, organizados en siete dominios inmunoglobulínicos (*Ig-like*), residiendo en el segundo y el tercer dominio la capacidad de unión a su ligando. A continuación, encontramos un único dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, un dominio tirosina quinasa dividido en dos, interrumpido por un inserto de quinasa de 70 aminoácidos y, finalmente, una cola C-terminal (Olsson et al., 2006).

El homodímero VEGFA tiene una afinidad muy alta para VEGFR-1, con una constante de disociación (Kd) de entre 10-20 pM, un orden de magnitud mayor que con el VEGFR-2. A pesar de esto, la actividad tirosina quinasa de receptor VEGFR-1 es diez veces menor que la de VEGFR-2, siendo este la principal señal que promueve la angiogénesis por su unión con su ligando (Sawano et al., 1996). VEGFR-3 pertenece a la misma familia, pero no actúa como receptor de



VEGFA, sino que sus ligandos son otras isoformas, tales como VEGFC y VEGFD (Karkkainen et al., 2002).



**Figura 3. Receptores VEGFR y sus respectivos ligandos.**

Como en el resto de los RTK, al unirse el ligando al receptor, se produce la dimerización de este último, activándose así la actividad quinasa, lo que lleva a una trans-autofosforilación de ciertos residuos de tirosina. En concreto, los dominios que resultan autofosforilados son el dominio de inserción de quinasa, el segundo dominio quinasa y el dominio carboxi-terminal. A continuación, estos receptores que han sido autofosforilados, atraen y reclutan ciertas proteínas, lo que da pie al inicio de cascadas de señalización intracelulares mediadas por segundos mensajeros produciéndose la fosforilación de otras proteínas, tales como el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C gamma (PLC- $\gamma$ ) la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) o la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR) (Roa, 2018).

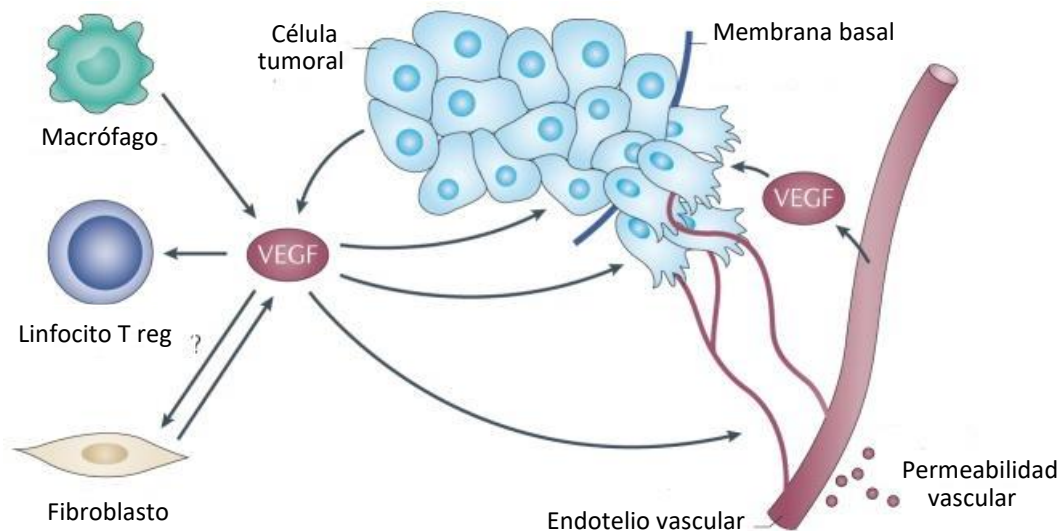
En cuanto al tipo celular que expresan estos receptores, encontramos que tanto VEGFR-1 como VEGFR-2 se expresan principalmente en células endoteliales. Además, se ha demostrado que VEGFR-1 es expresado también en monocitos, macrófagos y células madre hematopoyéticas, las cuales expresan también VEGFR-2. El caso de VEGFR-3, encargado de la regulación de la linfangiogénesis, su presencia se limita a las células endoteliales del sistema linfático (Cross et al., 2003).

Cabe mencionar otro tipo de receptores: las neuropilinas (NRP). NRP-1 y NRP-2, que son glicoproteínas transmembrana que inicialmente se identificaron como receptores neuronales de semaforinas de clase 3, cuyo papel es crucial en el desarrollo del sistema nervioso. Su función generalmente se basa en ser correceptores, ya que carecen de dominios catalíticos que les permitan desencadenar una ruta de señalización (Pellet-Many et al., 2008). Además, se ha demostrado que estas moléculas transmembrana, también se encuentran en las células

endoteliales, actuando como receptores de VEGF y, por tanto, realizan un papel crucial en angiogénesis fisiológica (Parker et al., 2012).

### 1.4.3. VEGF en el microambiente tumoral

En el contexto del microambiente tumoral, el VEGF liberado de forma paracrina tanto por las células tumorales como por las células estromales tiene dos funciones principales: estimular la angiogénesis y aumentar la permeabilidad vascular. En cuanto a la angiogénesis, la unión a los receptores de VEGF activa las vías de señalización que permiten la proliferación y la migración de células endoteliales, además de capacitarlas para la degradación y el remodelado de la matriz extracelular. Por otro lado, el aumento de la permeabilidad vascular favorece el depósito de una matriz compuesta por fibrina, lo que desemboca en un estroma desmoplásico. Contrariamente, la secreción autocrina de VEGF por parte de las células tumorales cumple funciones independientes de la neovascularización como la dediferenciación o la transición epitelio-mesenquimal, que lleva consigo un aumento de la capacidad de invasión y supervivencia tumorales (Cao et al., 2012).



**Figura 4. Funciones de VEGF en el ambiente tumoral.**

Se ha demostrado que la vía de señalización principal en las células tumorales es la autocrina (Lee et al., 2012) (Perrot-Appianat y Di Benedetto, 2012), y que se trata de una vía regulada en varios niveles. Así, la expresión génica de VEGF se ve favorecida por situaciones de hipoxia y por vías de señalización oncogénicas. Referente a la hipoxia, mediante el factor inducible de hipoxia (HIF) y bajo condiciones de baja tensión de oxígeno se induce la expresión de VEGF. Sumado a esto, hay una gran variedad de factores de crecimiento, entre los que se incluyen EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , KGF, IGF-1, FGF y PDGF, que regulan positivamente la expresión del ARNm del gen VEGFA, lo que sugiere que la liberación tanto paracrina como autocrina de estos factores, junto con la hipoxia, regulan la liberación de VEGF en el microambiente tumoral (Ferrara et al., 2003). Por último, ciertas mutaciones oncogénicas, como la supresión del gen von Hippel-Lindau (vHL), conllevan también una inducción de la expresión de VEGF (Patard et al., 2009).

Interesantemente, la hipótesis de que VEGF señala de manera autocrina y contribuye en ciertas funciones de las células tumorales supone que estas células también expresan en sus superficies receptores VEGFR y NRP. Así, se ha dejado atrás la idea de que la expresión de este tipo de receptores se limitaba únicamente a células endoteliales, ya que se ha visto que muchos tipos de tumores expresan estos receptores de VEGF, existiendo incluso una correlación entre su expresión y ciertos parámetros clínicos, como la metástasis (Goel y Mercurio, 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que la expresión dependiente de VEGFR-1 de la metaloproteinasa-9 de la matriz en células endoteliales del tumor premetastásico de pulmón, impulsa la metástasis pulmonar (Kaplan et al., 2005).

Cabe destacar también la influencia del VEGF en las células inmunes del microambiente tumoral. Estas células, como es el caso de algunos linfocitos T reguladores, pueden presentar receptores para VEGF, por tanto, su función depende de la señalización por VEGF, de manera que queda afectada la respuesta antitumoral del sistema inmune del huésped (Goel y Mercurio, 2013).

#### **1.4.4. Inhibidores de la angiogénesis como estrategia contra el cáncer**

Gracias a este conocimiento sobre la neoangiogénesis tumoral y al papel de VEGF/VEGFR, ya en los años 70 se teorizó sobre la importancia de inhibir este proceso con el objetivo de limitar al máximo la progresión tumoral, especialmente de aquellos cánceres más agresivos. Se abrió así una nueva puerta en el tratamiento contra el cáncer, centrando los esfuerzos en una estrategia antiangiogénica que pueda servir como una alternativa a la quimioterapia tradicional o como un complemento de esta. Hasta la fecha, se han descubierto más de 300 inhibidores de la angiogénesis, los cuales se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de las distintas etapas del proceso angiogénico a las que se dirigen (Foldevila, 2004):

-Inhibidores directos de las células endoteliales, que provocan su apoptosis

-Inhibidores de la cascada de señalización, que interfieren tanto en la producción de VEGF, en su unión a su receptor, como en el propio receptor VEGFR. Dentro de este grupo, cabe destacar los inhibidores dirigidos a los dominios quinasa, que, a su vez, se dividen en tres tipos principales que se diferencian en el sitio de unión al receptor.

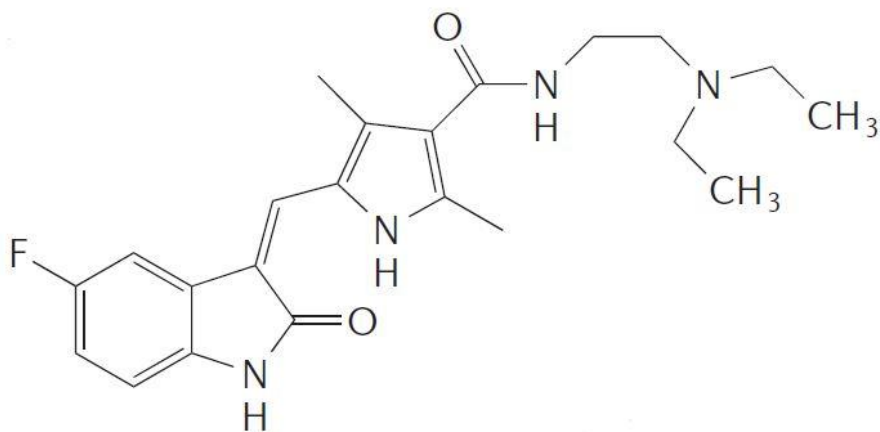
-Por último, se encuentran los inhibidores que tienen como objetivo las metaloproteinasas, bloqueándolas y evitando así la degradación de la matriz extracelular.

#### **1.5. Sunitinib**

Debido al éxito de inhibidores quinasa en la terapia contra el cáncer, en concreto del mesilato de imatinib (Gleevec; Novartis), se han desarrollado más moléculas inhibitoras de quinasa, más concretamente inhibidores de múltiples quinasas, ya que se ha visto que proporcionan una actividad antitumoral efectiva con una toxicidad aceptable. De esta manera, y gracias a los datos obtenidos de modelos preclínicos de que la inhibición de los receptores VEGFR representa una diana farmacológica para evitar el crecimiento y la progresión tumorales, se identificó sunitinib (Atkins et al., 2006) que además de ser un potente inhibidor, presenta buenas características de unión a proteínas, solubilidad y biodisponibilidad (Sun et al., 2003).

Sunitinib (Sutent; Pfizer) es una pequeña molécula derivada del indol (Figura 5) que actúa como inhibidor de múltiples receptores de tirosina quinasa (TKI), entre los que se encuentran: el

receptor del factor de células madre (c-kit), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor neurotrófico derivado de la glía, el receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSFR1), el receptor tirosina quinasa 3 similar a FMS (FLT3), y VEGFR (Kim et al., 2014).



**Figura 5.** Estructura química de sunitinib.

### 1.5.1. Mecanismo de acción

Sunitinib se engloba dentro de los inhibidores de tipo I de VEGFR y el mecanismo por el cual actúa es el siguiente: en primer lugar, el compuesto penetra en la célula para, a continuación, entrar en competencia con el ATP para unirse al dominio en forma de bolsillo de unión al ATP de VEGFR. De esta manera, impide la activación del receptor, de modo que tanto la fosforilación como la activación de la ruta de señalización aguas abajo quedan interrumpidas (Delbaldo et al., 2012).

Las tirosina quinasas transfieren covalentemente un grupo fosfato de un ATP donador a residuos de tirosina de otras proteínas. Para que tenga lugar esta reacción, se necesitan tres sitios: sitio de unión al ATP, un dominio catalítico para la transferencia del grupo fosfato y un sitio de unión para el sustrato. En este caso, tras la unión del ligando al VEGFR se produce la dimerización, que permite a los dominios quinasa intracelulares orientarse de manera precisa y que se produzca la autofosforilación (Carda, 2015).

Así pues, el dominio quinasa de los VEGFR adquiere especial importancia para la actividad inhibitoria de ciertos antineoplásicos. Se trata de una estructura bilobular, compuesta por un lóbulo N pequeño y un lóbulo C grande, en la interfaz de los cuales se encuentra el bolsillo de unión al ATP. Ambos lóbulos se encuentran unidos por un bucle llamado bisagra y la unión del ATP depende de la conformación de estos tres lóbulos (Modi y Kulkarni, 2019).

El bolsillo de unión al ATP del receptor está repartido en tres regiones: dos regiones hidrofóbicas (HYD) y una región hidrofílica. Los inhibidores competitivos de tipo I, entre los que se encuentra sunitinib, se unen a la región HYD-I, que es el sitio de unión a la adenina, formando enlaces de hidrógeno con aminoácidos de la región de la bisagra (Huang et al., 2012).

### 1.5.2. Uso terapéutico

Sunitinib es un antineoplásico de vía oral que alcanza la concentración plasmática máxima entre 6 y 12 horas después de su ingesta. El estado de concentraciones estables de sunitinib en el plasma se alcanza tras 10-14 de tratamiento a la dosis diaria de 25-50 mg/mL, siendo el rango de concentraciones plasmáticas efectivas entre 62,9 y 101 ng/mL (Pfizer Labs, 2006). Es por esto, que en este trabajo las concentraciones empleadas para testar este fármaco fueron de 20, 100 y 500 ng/mL, concentraciones que se encuentran alrededor de las plasmáticas.

La FDA ha aprobado el uso de sunitinib en los siguientes casos (FDA, 2017):

- a) El tratamiento del tumor estromal gastrointestinal (GIST) tras su progresión y metástasis, o en caso de intolerancia al mesilato de imatinib.
- b) El tratamiento del carcinoma de células renales (RCC) avanzado, o como adyuvante en aquellos pacientes adultos que sufren un riesgo elevado de presentar RCC tras una operación de nefrectomía.
- c) El tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos (pNET) en aquellos pacientes que presentan estos tumores bien diferenciados en un estado avanzado de progresión local o metastásico, donde es imposible su eliminación mediante cirugía.

### 1.5.3. Estudios de toxicidad cutánea

Los efectos de toxicidad cutánea por sunitinib suelen aparecer después de 3-4 semanas de tratamiento (Faivre et al., 2006). De entre los numerosos efectos secundarios asociados a la piel, entre los que se encuentran el síndrome mano-pie, eritemas multiformes o el síndrome de Stevens-Johnson, vamos a destacar el *rash*, es decir, una erupción cutánea con lesiones dérmicas cuya causa puede ser la dermatitis de contacto (Kollmannsberger et al., 2007).

Los ensayos clínicos realizados por la propia compañía farmacéutica, en los que participaron 7.527 pacientes de GIST, RCC y pNET pusieron de manifiesto que la prevalencia de *rash* a causa del sunitinib fue de entre el 14 al 29 %, dependiendo del tipo de tumor tratado (Pfizer, 2017).

De un estudio realizado entre 2006 y 2011 en la República Checa, en el que se analizó la toxicidad cutánea de 811 pacientes de RCC tratados con sunitinib, el 7,2% presentaba una toxicidad dermatológica significativa, de los cuales 8 pacientes (1,1%) mostraban un *rash* severo (Poprach et al., 2012).

La información recabada en otro estudio clínico actualmente en fase III, muestra que, un total de 47 pacientes (11,1%) han desarrollado *rash* cutáneo, 2 de los cuales (0,5%) suponen un grado 3 o superior (Rini et al., 2019).

Todos estos datos, llevan a pensar que los efectos tóxicos sobre la piel de sunitinib son considerables, y que los modelos in vitro e in chemico que se abordan en este trabajo deberían mostrar su positividad para toxicidad cutánea. Y así, sentar las bases de una estrategia alternativa de predicción del potencial sensibilizante de antineoplásicos, para evaluar los beneficios frente a los posibles riesgos en fase preclínica y sin el uso de animales de experimentación. Además, cabe destacar que ciertos estudios informan sobre la correlación entre el daño dérmico, más o menos severo, con la eficacia del fármaco y la supervivencia de los pacientes, es decir, a más toxicidad cutánea, mayor supervivencia general o libre de progresión (Poprach et al., 2012), lo que realza la importancia de predecir con anterioridad la sensibilidad cutánea.

## **1.6. Bevacizumab**

Para suplir la necesidad de encontrar nuevas terapias que eviten la señalización de VEGF, se han generado varios anticuerpos monoclonales murinos, utilizando VEGF humano recombinante como inmunógeno. En concreto, se han producido cuatro anticuerpos monoclonales (A3.13.1, A4.6.1, B4.3.1 y B2.6.2), de entre los cuales destaca A4.6.1 por su alta afinidad y su capacidad de unirse a más isoformas de VEGF (Kim et al., 1992).

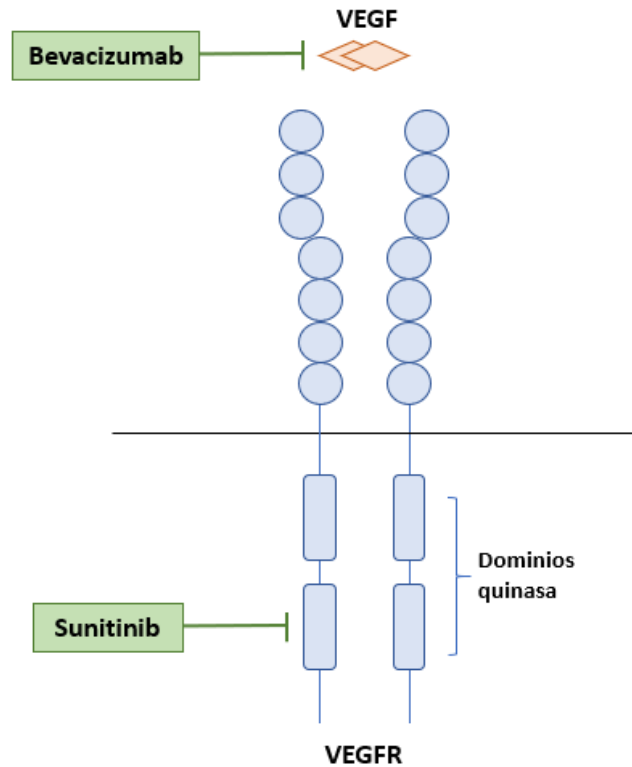
Hace ya más de 20 años, en 1997, y con el fin de prevenir los efectos inmunológicos adversos derivados de emplear anticuerpos murinos en humanos y de aumentar su vida media, se llevó a cabo la humanización del anticuerpo murino anti-VEGF A4.6.1, el anticuerpo predecesor a bevacizumab en ratones (Presta et al., 1997). Este avance permitió la aprobación en 2004 por parte de la FDA de Avastin -cuyo principio activo es bevacizumab- convirtiéndose en el primer tratamiento antiangiogénico general para pacientes con tumores en estado avanzado (Ecker et al., 2015).

Bevacizumab (Avastin, Genentech-Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado que reconoce y se une específicamente al VEGFA, incluyendo todas sus isoformas y los fragmentos proteolíticos bioactivos (Sousa et al., 2017).

### **1.6.1. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción de bevacizumab es simple: neutraliza el factor de crecimiento VEGF de forma que inhibe la interacción de este factor con su receptor, evitando su activación (Muller et al., 1998).

Gracias a técnicas de cristalografía, se ha determinado tanto la estructura de bevacizumab, como del complejo que forma con VEGF, permitiendo esclarecer de manera más precisa su mecanismo de acción. Aun cuando los residuos críticos de unión de VEGF con su receptor son distintos de aquellos que permiten su unión al anticuerpo, todos ellos ocupan una región común. Esto quiere decir que el efecto neutralizante del anticuerpo consiste en un bloqueo alostérico del factor de crecimiento con su receptor, ya que el epítipo de unión con el anticuerpo se superpone con el epítipo de unión al receptor (Muller et al., 1998).



**Figura 6.** Esquema de los mecanismos de acción de bevacizumab y sunitinib.

### 1.6.2. Uso terapéutico

Bevacizumab es un fármaco que se administra mediante una infusión intravenosa y que alcanza su pico de concentración tras los 14 días, siendo su farmacocinética lineal en el intervalo de dosis 1 a 10 mg por kg. La concentración máxima alcanzada es de aproximadamente 284  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por tanto, las concentraciones probadas en este estudio fueron 100, 300 y 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (FDA, 2013).

Este antiangiogénico está indicado para tratar los siguientes casos (FDA,2018):

- a) Cáncer colorrectal metastásico (mCRC), junto con una quimioterapia que presente algún fármaco fluoropirimidínico, siendo la primera o la segunda línea en el tratamiento de este tumor.
- b) Cáncer de pulmón no microcítico de células no pequeñas avanzado (NSCLC), en combinación con paclitaxel y carboplatino.
- c) Cáncer renal metastásico (mRCC) con interferón  $\alpha$ .
- d) Glioblastoma (GBM)
- e) Carcinoma avanzado o metastásico de cérvix uterino, junto con paclitaxel más cisplatino o paclitaxel más topotecán.
- f) Cáncer de ovario, en combinación con carboplatino y paclitaxel, seguido de un tratamiento únicamente con bevacizumab. También se emplea en los carcinomas avanzados del epitelio ovárico, las trompas de Falopio o del peritoneo primario.

### 1.6.3. Estudios de toxicidad cutánea

En pacientes que han recibido bevacizumab junto con quimioterapia (paclitaxel, carboplatino) se han observado una serie de efectos adversos, entre los que se encuentran un conjunto de reacciones alérgicas relacionadas con la piel, con manifestaciones clínicas frecuentes como enrojecimiento, erupciones, sequedad, descamación e inflamación (Roche, 2017).

Durante los ensayos clínicos llevados a término para la aprobación del fármaco, concretamente en el ensayo GOG-0213, los datos mostraron que 75 pacientes que recibieron un tratamiento conjunto de bevacizumab con carboplatino y paclitaxel (23%) presentaron un *rash* exfoliativo, en contraposición con el 16% de pacientes cuyo tratamiento consistía únicamente en carboplatino y paclitaxel (FDA, 2019).

En el ensayo clínico E4599, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con paclitaxel-carboplatino o con paclitaxel-carboplatino-bevacizumab, presentando estos últimos síntomas como *rash* o descamación de la piel del 2,3%, frente al 0,5% del grupo sin bevacizumab (Sandler et al., 2006).

Otro estudio en fase III realizado en los Países Bajos, en el que se quería determinar la eficacia del tratamiento de mantenimiento con capecitabina junto con bevacizumab para el mCRC, muestra efectos tóxicos relacionados con la piel. Los resultados obtenidos detectaron que el 23% de los pacientes que se sometieron a este tratamiento de mantenimiento presentaron reacciones cutáneas mano-pie, en comparación con ningún paciente dentro del grupo de observación sin tratamiento (Simkens et al., 2015).

Al igual que ocurría con sunitinib, existen estudios que correlacionan la severidad del daño cutáneo producido por ciertos anticuerpos empleados contra el cáncer, como cetuximab, bevacizumab o panitumumab, con la supervivencia general o libre de progresión (Price et al., 2016).



## 2. OBJETIVOS

- Estudiar y evaluar el potencial sensibilizante de dos fármacos antineoplásicos – sunitinib y bevacizumab- mediante las técnicas *in chemico* e *in vitro* DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT.
- Determinar la adecuación y la conformidad de estas técnicas para la evaluación del potencial sensibilizante de determinados fármacos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Fármacos

Los fármacos empleados para el estudio de sensibilización fueron los antineoplásicos Sunitinib (Selleckchem, S7781) y Bevacizumab (Selleckchem, A2006), a las siguientes concentraciones:

**Tabla 1: Fármacos utilizados y sus concentraciones**

Fármaco	Concentraciones		
Sunitinib (ng/ml)	20	100	500
Bevacizumab (µg/ml)	100	300	600

#### 3.2. Cultivos celulares

Se llevaron a cabo en una sala de cultivos celulares, equipada con campanas de flujo laminar, incubadores y zona de vestuario, para incorporar los EPI al trabajador (guantes, gafas, gorro, bata y peucos). En esta sala, se trabaja reproduciendo condiciones de laboratorio de bioseguridad de nivel 2.

##### 3.2.1. Cultivo rutinario línea celular KeratinoSens

Para mantener el cultivo rutinario de KeratinoSens (Givaudan Schweiz AG) se emplearon frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), low glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate (Gibco, 11570586) 9,1% Fetal Calf Serum (FCS) (Amimed, 2-01F00-I) con Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/mL) (Gibco, 11558616) y se dejaron crecer a unas condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C y un 95% humedad hasta alcanzar la confluencia celular deseada, en este caso 80-90%.

##### 3.2.2. Cultivo rutinario línea celular THP-1

Para mantener el cultivo rutinario de la línea celular THP-1, los frascos empleados fueron de 175 cm<sup>2</sup> con el medio RPMI-1640 (ATCC, 30-2001) suplementado con un 10% de Fetal Bovine Serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, SV30160.03), con una mezcla de 100 unidades/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomina (Lonza, DE 17-602E). Se dejaron crecer los monocitos manteniendo unas condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>, temperatura de 37°C y 95% humedad, hasta alcanzar la confluencia deseada.

### 3.3. Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

Para llevar a cabo el ensayo DPRA se prepararon dos soluciones peptídicas en fresco justo antes de su incubación con el compuesto a testar: una solución que contenía péptidos sintéticos de cisteína (Ac-RFAACAA-COOH) (Genosphere Biotechnologies), y la otra con péptidos sintéticos de lisina (Ac-RFAAKAA-COOH) (Genosphere Biotechnologies). Para la primera solución se empleó un tampón fosfato a pH 7,5 para alcanzar una concentración final de 0,667 mM, mientras que para conseguir la solución del péptido de lisina a la misma concentración se usó tampón de acetato de amonio a pH 10,2. Por otra parte, la preparación del compuesto a testar, en este caso sunitinib, se realizó a varias concentraciones (20, 100, 500 ng/mL) en un vial de vidrio (Agilent Technologies, 5190-9062) y se incubaron con las soluciones peptídicas de cisteína y lisina en una proporción de 1:10 y 1:50, respectivamente, en condiciones de oscuridad y temperatura de  $25\pm 2,5^{\circ}\text{C}$  durante  $24\pm 2$  horas previas a la ejecución del análisis mediante HPLC.

Como incidencia, cabe resaltar el hecho de que el análisis mediante la técnica de DPRA no se realizó para el antineoplásico bevacizumab, ya que se trata de un anticuerpo cuyo tamaño imposibilita su paso por la columna del HPLC, según marca la OECD.

Como control de referencia (C) se usó una disolución que contenía el péptido y en la que el compuesto a testar o el control se sustituyó por el disolvente empleado. Adicionalmente, se emplearon como controles positivos el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (Sigma Aldrich, 237329-10G) y el aldehído cinámico (Sigma Aldrich, W228613-100G-K); y el ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K) y la 6-metilcoumarina (Sigma Aldrich, W269905-100G-K) como controles negativos.

Con el fin de poder interpolar los resultados obtenidos, se realizó de manera previa una curva de calibración estándar para cada uno de los péptidos. Se prepararon 6 diluciones seriadas tanto para la cisteína como para la lisina, de manera que el rango de concentraciones iba de 0,534 a 0,0167 mM, incluyendo un séptimo valor STD7 que constituía el blanco del tampón de dilución.

Además, para asegurarse de la correcta ejecución del experimento se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de aceptación marcados por la OECD:

- a) La recta de calibración estándar debe tener una  $r^2 > 0,99$ .
- b) El valor de la media de la depleción peptídica de las tres réplicas del control positivo (aldehído cinámico) debe ser tener un valor entre el 60,8% y el 100% en el caso de la cisteína.
- c) El coeficiente de variación (CV) del área del pico del control de referencia C en acetonitrilo debe ser menos del 15%.
- d) La desviación estándar máxima entre las réplicas del compuesto debe ser  $< 14,9\%$  para el porcentaje de depleción de la cisteína.
- e) La media de la concentración peptídica de los 3 controles de referencia C en su disolvente adecuado debe ser  $0,5\pm 0,05\text{mM}$ .

El porcentaje de depleción peptídica se monitorizó mediante HPLC (Shimadzu 10AD) compuesto por bomba (Shimadzu 10AD), autoinyector (Shimadzu 10AD), horno de columna (Waters) y un detector UV (Shimadzu 10AV), que midió el área bajo la curva a una longitud de onda de 220nm. La columna utilizada fue una columna de fase reversa Zorbax SB-C-18 2,1mm x 100mm x 3,5 $\mu\text{m}$

(Agilent, 861753-902). La fase móvil se preparó con 50% de 0.1% (v/v) ácido trifluoroacético en agua y 50% de 0.085% (v/v) ácido trifluoroacético en acetonitrilo y se mantuvo a una Tª estable de 30°C y a un flujo de 0.35 mL/min. Para cada muestra se realizó un gradiente lineal de 10 a 25% de 0.085% (v/v) ácido trifluoroacético en acetonitrilo durante los primeros 10 minutos, a continuación, se incrementó rápidamente a 90% de acetonitrilo para eliminar posibles restos de muestra de la columna y finalmente se reequilibró con la fase móvil de inicio durante 5 min. El volumen de muestra inyectado fue de 10µL. El tiempo de retención de la cisteína fue de 8,5 min.

Se calculó la concentración de péptido de cisteína como el área del pico, es decir, el área debajo de la curva, interpolando gracias a la curva de calibrado estándar previamente realizada. A continuación, el porcentaje medio de depleción peptídica fue determinado para cada compuesto mediante la siguiente fórmula:

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

Por último, los datos obtenidos se interpretaron siguiendo el modelo de predicción de DPRA, como podemos observar en la Tabla 2:

**Tabla 2. Modelo de predicción de DPRA basado en el porcentaje de disminución peptídica de la cisteína.**

Media del % de la depleción de cisteína	Tipo de reactividad	Predicción de DPRA
0% ≤ % depleción cisteína ≤ 13,89%	Reactividad nula o mínima	Negativo
13,89% ≤ % depleción cisteína ≤ 23,09%	Reactividad baja	Positivo
23,09% ≤ % depleción cisteína ≤ 98,24%	Reactividad moderada	
98,24% ≤ % depleción cisteína ≤ 100%	Reactividad alta	

### 3.4. KeratinoSens™

Tras haber alcanzado una confluencia aproximada de entre 80-90%, las células se tripsinizaron con TrypLE™ Select Enzyme (1X) (Gibco, 12563029). Acto seguido, se sembraron a una densidad celular de 10000 células/pocillo en 4 placas de 96 pocillos, 3 de las cuales eran opacas (Greiner Bio-One, 655083) para el experimento de luminiscencia, y 1 placa transparente (Sigma Aldrich, CLS3595-50EA) para el ensayo de MTT. Las células se mantuvieron en el incubador durante 24 horas en medio DMEM 9,1% FCS sin antibióticos. Pasado este tiempo, se retiró el medio y se sustituyó por el medio DMEM 1% FCS sin antibióticos que contenía el compuesto determinado a las diferentes concentraciones, dejándolas incubar durante 48 horas en unas condiciones de 37°C de temperatura y una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido este intervalo de tiempo, se llevaron a cabo los ensayos de luminiscencia y MTT.

En primer lugar, con el fin de llevar a cabo el ensayo de la actividad de la luciferasa se empleó el kit Luciferase Assay System 10-pack (Promega, E1501) y el Passive Lysis 5X Buffer (Promega, E1941). El primer paso realizado fue aspirar el sobrenadante de las placas y realizar dos lavados con Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Biowest, L0615-500) para así eliminar cualquier resto de medio. Seguidamente, en cada pocillo se añadieron 20 µL de la solución de

lisis 1X dejando incubar 20 minutos en agitación y a temperatura ambiente. Inmediatamente después, y sin retirar la solución de lisis, se adicionaron 50 µL del sustrato y se procedió a la lectura de la luminiscencia con el luminómetro (LUMIstar Omega, BMG Labtech).

Por último, se realizó el ensayo de citotoxicidad MTT, para el cual, pasadas las 48 horas de incubación, el medio fue reemplazado por 200 µL de medio fresco DMEM con 1% de FCS sin antibióticos. A continuación, a cada pocillo se añadieron 27 µL de una solución de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma Aldrich, M2128-1G) a una concentración de 5 mg/mL en DPBS. Las células se dejaron incubando durante 4 horas a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se retiró el medio y se incorporaron 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por pocillo, dejando las placas en agitación durante 10 minutos, para, finalmente, medir la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan).

En cuanto a los controles empleados en esta técnica, como controles positivos se usaron el DNCB (Sigma Aldrich, 237329-10G) y el aldehído cinámico (Sigma Aldrich, C80687-25G). De entre las sustancias no sensibilizantes empleadas como controles negativos, se empleó el ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K) y el isopropanol (Sigma Aldrich, I9516-25ML).

A partir de los datos obtenidos en las dos pruebas, se obtuvieron los siguientes parámetros:

- La inducción de la actividad de la luciferasa, que se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$I_{m\acute{a}x} = \frac{L_{muestra} - L_{blanco}}{L_{solvente} - L_{blanco}}$$

Donde

$L_{muestra}$  es la lectura de luminiscencia del pocillo del compuesto testado.

$L_{blanco}$  es la lectura de luminiscencia del pocillo blanco que no contiene ni células ni compuesto.

$L_{solvente}$  es la media de las lecturas de los pocillos del control negativo, que contienen células y solvente (medio).

- Para el cálculo del valor de la EC<sub>1.5</sub>, que representa la concentración para la cual la inducción de la actividad de la luciferasa supera en 1,5 veces el umbral con respecto al solvente, se empleó la siguiente ecuación:

$$EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left( \frac{1,5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

Donde

$C_a$  es la concentración más pequeña con una  $I_{m\acute{a}x} > 1,5$ .

$C_b$  es la concentración más grande con una  $I_{m\acute{a}x} < 1,5$ .

$I_a$  es el valor de  $I_{m\acute{a}x}$  para la concentración menor con una  $I_{m\acute{a}x} > 1,5$  ( $C_a$ ).

$I_b$  es el valor de  $I_{m\acute{a}x}$  para la concentración mayor con una  $I_{m\acute{a}x} < 1,5$  ( $C_b$ ).

- La viabilidad celular obtenida en el ensayo de MTT se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Donde

$V_{\text{muestra}}$  es la lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo del compuesto testado.

$V_{\text{blanco}}$  es la lectura de la absorbancia del MTT en el pocillo blanco que no contiene ni células ni compuesto.

$V_{\text{solvente}}$  es la media de las lecturas de la absorbancia de los pocillos de control negativo, que contienen células y solvente (medio).

- Los valores de concentración de  $IC_{50}$  e  $IC_{30}$ , es decir, la concentración para la cual se induce una reducción de la viabilidad celular del 50% y del 30%, respectivamente, se calcularon con la siguiente ecuación:

$$IC_X = (C_b - C_a) \times \left( \frac{(100 - X) - v_a}{v_b - v_a} \right) + C_a$$

Donde

X es el % de reducción a la concentración que se debe calcular (50 para la  $IC_{50}$  y 30 para la  $IC_{30}$ ).

$C_a$  es la concentración más baja con una reducción de la viabilidad  $> X\%$ .

$C_b$  es la concentración más alta con una reducción de la viabilidad  $< X\%$ .

$V_a$  es el % de viabilidad a la concentración menor con una reducción de la viabilidad mayor del  $X\%$  ( $C_a$ ).

$V_b$  es el % de viabilidad a la concentración mayor con una reducción de la viabilidad menor del  $X\%$  ( $C_b$ ).

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de aceptación para poder considerar el experimento de KeratinoSens™ como válido:

- La inducción de la actividad de la luciferasa para el control positivo, es decir, el aldehído cinámico, debe ser estadísticamente significativa por encima del umbral de 1,5 (prueba t de Student), en al menos una de las concentraciones.
- El valor de la EC1.5 del aldehído cinámico debe estar entre 7 y 30  $\mu\text{M}$ . Asimismo, la media de las tres réplicas de la inducción del aldehído cinámico para la mayor concentración (64 $\mu\text{M}$ ) debe estar entre 2 y 8.
- El coeficiente de variación de la lectura de la luminiscencia para el control del solvente debe ser menor del 20% en cada réplica.

Además, para poder considerar una predicción positiva para KeratinoSens™, se deben cumplir las siguientes condiciones, en las 2 repeticiones del experimento o en 2 de las 3 repeticiones, en caso de discrepancia entre la primera y la segunda repetición:

- La  $I_{\text{máx}}$  debe ser igual o mayor de 1,5 y estadísticamente significativa en comparación con el control negativo.
- La viabilidad celular debe ser mayor del 70% para la concentración más baja del compuesto con una  $I_{\text{máx}} \geq 1,5$ .
- La EC1.5 debe ser menor de 1000  $\mu\text{M}$  o 200  $\mu\text{g/mL}$ .
- Debe haber un incremento dosis-respuesta en la luminiscencia.

### 3.5. h-CLAT

El punto de partida fue recuperar los monocitos THP-1 mediante una centrifugación a 1200 rpm, para poder sembrarlos en placas de 24 pocillos (Corning, 3526) a una densidad celular de 500000 células/pocillo. Una vez sembradas las placas, se dejaron en el incubador durante media hora para que las células se estabilizaran. El siguiente paso fue añadir a cada pocillo tanto los compuestos a testar como los controles determinados, que en este caso fueron el isopropanol (Sigma Aldrich, I9516-25ML) y el ácido láctico (Sigma Aldrich, W261114-1KG-K) como controles negativos, y el sulfato de níquel (Sigma Aldrich, N4882-1KG) y el DNCB (Sigma Aldrich, 237329-10G) como controles positivos. La manera de proceder fue la siguiente: por cada condición, ya sea fármaco o control, se contaba con 3 pocillos, uno se empleó para detectar CD86, uno para CD54 y otro para el control de isotipo de la IgG. Tras esto, las placas se dejaban incubar durante 24 horas a 37°C y una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente, transcurridas las 24 horas se agitaron ligeramente las placas para resuspender los monocitos y se transfirió el contenido de cada pocillo a un tubo eppendorf diferente, de manera que el volumen de cada pocillo ahora se encuentra en un tubo distinto. Estos tubos se centrifugan durante 5 minutos a 4°C y a 1500 rpm, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en un tampón de bloqueo con globulina al 0,01% (Sigma-Aldrich, G2388-10G) en Staining Buffer (Invitrogen, 00-4222-26). Se dejó incubar durante 15 minutos a una temperatura de 4°C.

Una vez pasado ese tiempo, se centrifugó y se retiró completamente el sobrenadante para añadir 50 µL de la solución de anticuerpos. Esto se trata de una solución de tinción que contiene anticuerpos monoclonales anti-humano conjugados con fluoresceína isocianato (FITC) en diferentes proporciones: CD86 (Dako, F7205) en una dilución 3:25 (v/v), y CD54 (Dako, F7143) e IgG (Dako, X0927) en una dilución 3:50 (v/v) en Staining Buffer. Así pues, cada respectiva solución se añadió en el tubo correspondiente, es decir, la solución anti-CD86 se adicionó en el tubo de CD86, y así sucesivamente. Una vez hecho, se dejó incubando en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con el Staining Buffer con centrifugaciones intermedias entre cada lavado. En la última de estas, el sobrenadante fue retirado y se resuspendió en 300 µL de Staining Buffer, para después añadir 2 µL de yoduro de propidio (PI) (Sigma Aldrich, P4170-100MG) (1mg/mL) a cada eppendorf. Por último, se preparó una placa transparente de 96 pocillos (Corning, 3590) a la que se transfirió el contenido de los tubos, y la cual se introdujo en el citómetro de flujo (BD LSR Fortessa X-20), para poder medir la intensidad de fluorescencia de los marcadores de superficie de los monocitos THP-1.

Con el fin de evaluar la expresión de CD86 y CD54 en la superficie celular, se calculó la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MFI) y la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) tanto de CD86 como de CD54. Para el cálculo de esta, se empleó la siguiente ecuación:

$$RFI = \frac{MFI \text{ de las cél. tratadas} - MFI \text{ del control isotipo de las cél. tratadas}}{MFI \text{ de las cél. control} - MFI \text{ del control isotipo de las cél. control}} \times 100$$

Para poder estimar como válido un experimento de h-CLAT, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de aceptación:

- a) La viabilidad de los controles negativos debe ser mayor del 90% y la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) no debe superar los parámetros positivos, es decir, mayor del 150% para CD86 y del 200% para CD54.
- b) Para el control positivo DNCB, la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) debe ser mayor del 150% para el CD86 y del 200% para el CD54. Además, la viabilidad celular no debe ser menor del 50%.
- c) La viabilidad celular del compuesto a testar debe superar el 50%.

Así, una predicción de h-CLAT se considera positiva, si se cumple como mínimo una de las siguientes condiciones en 2 de 2 repeticiones, o en 2 de 3 repeticiones si es necesaria una tercera repetición para solucionar posibles discrepancias entre la primera y la segunda repetición:

- La intensidad relativa de fluorescencia (RFI) de CD86 debe ser  $\geq 150\%$  en al menos una de las concentraciones probadas, y la viabilidad celular debe ser  $\geq 50\%$ .
- La intensidad relativa de fluorescencia (RFI) de CD54 debe ser  $\geq 200\%$  en al menos una de las concentraciones probadas, y la viabilidad celular debe ser  $\geq 50\%$ .

De manera adicional, en aquellos compuestos cuya predicción fue positiva, se emplearon sus valores de la RFI obtenidos, y se calculó la concentración mínima que induce una respuesta sensibilizante positiva. Para el CD86 se empleó una RFI del 150% (EC150), mientras que, para el CD54, una RFI de 200% (EC200), utilizándose las siguientes fórmulas:

$$EC150 \text{ (para CD86)} = B_{conc} + \left[ \frac{150 - B_{RFI}}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \times (A_{conc} - B_{conc}) \right]$$

$$EC200 \text{ (para CD54)} = B_{conc} + \left[ \frac{200 - B_{RFI}}{(A_{RFI} - B_{RFI})} \times (A_{conc} - B_{conc}) \right]$$

Donde

$A_{conc}$  es la concentración más pequeña para la que se obtiene una RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54).

$B_{conc}$  es la concentración más alta para la que se obtiene una RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54).

$A_{RFI}$  es el valor de RFI para la concentración más baja con un RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54)

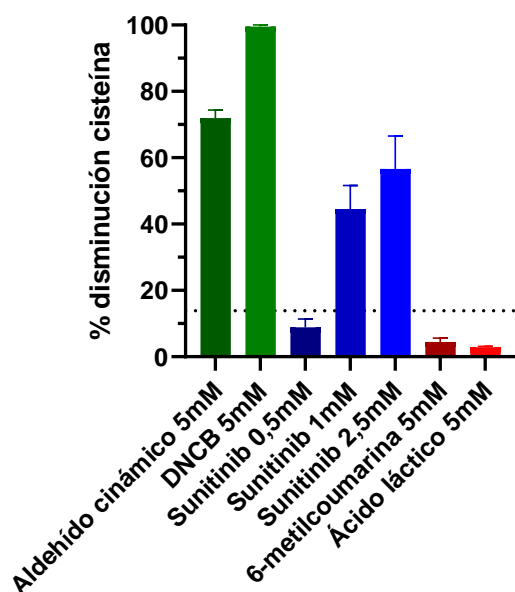
$B_{RFI}$  es el valor de RFI para la concentración más alta con un RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Sunitinib

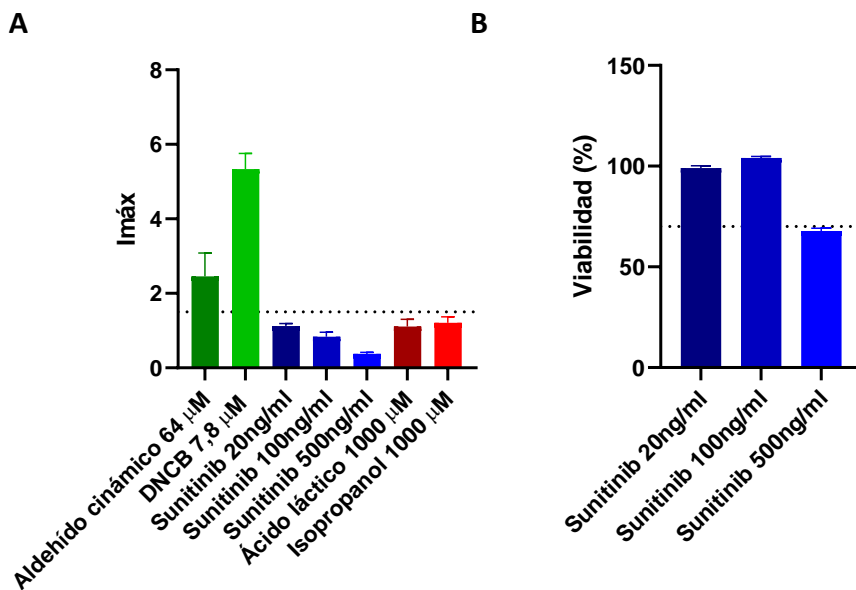
Tras pasar las muestras por el HPLC, los datos de las áreas bajo la curva de los picos fueron interpretados y se calculó el porcentaje de depleción de la cisteína (Figura 6).



**Figura 7. Análisis de la disminución peptídica de la cisteína tras 24 horas de incubación con los compuestos.** Sunitinib; aldehído cinámico y DNCB como controles positivos, y 6-metilcoumarina y ácido láctico como controles negativos.

Como se puede observar en la Figura 6, en el caso del 6-metilcoumarina y el ácido láctico, no se supera el umbral de depleción > 13.89% y, por tanto, estos compuestos se clasifican como no sensibilizantes. No es el caso del aldehído cinámico y el DNCB donde los valores de depleción están por encima del 70%, por lo que, dichos compuestos, sí que son sensibilizantes y tienen una reactividad moderada y fuerte, respectivamente. En el caso de sunitinib, a una concentración de 0.5 mM, el compuesto no se considera sensibilizante al no tener un porcentaje > 13.89% de depleción, sin embargo, a partir de concentraciones mayores como 1 mM, se puede observar cómo aumenta el porcentaje de depleción siguiendo una correlación dosis-respuesta y considerándose sensibilizante con una reactividad moderada (entre 23,09% y 98,24%)

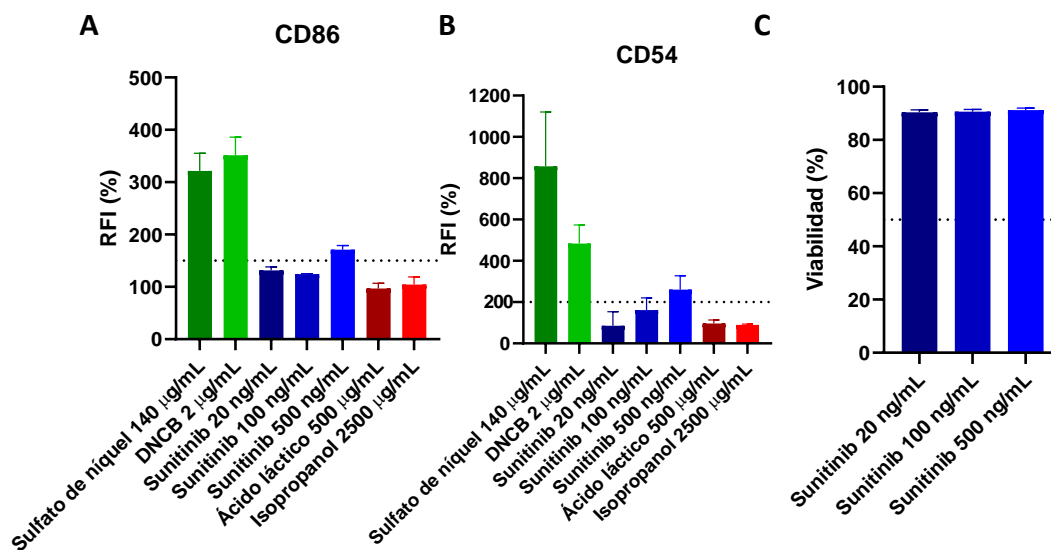
En cuanto a la técnica de KeratinoSens™, una vez realizados los dos ensayos, el de luminiscencia y el MTT, los resultados obtenidos se analizaron y se representaron como se muestra en la Figura 7.



**Figura 8. Efectos de sunitinib sobre la línea celular KeratinoSens.** Representación de la actividad de la luciferasa (Imax) (A) y de la viabilidad celular (B) tras 48 horas de incubación con sunitinib y los controles correspondientes: aldehído cinámico y DNCB como controles positivos y ácido láctico e isopropanol como controles negativos.

Como se muestra en la Figura 7A, sunitinib da un resultado negativo, ya que ninguna de sus concentraciones supera en 1,5 puntos la inducción de la actividad de la luciferasa. Además, se observa una tendencia negativa, es decir, al aumentar la concentración de sunitinib, disminuye la Imax. Esto, para la concentración más alta, se corresponde con la Figura 7B, ya que a concentraciones de 500ng/mL de sunitinib, la viabilidad celular disminuye por lo que al ser un compuesto citotóxico y reducir la confluencia celular, hay una bajada de la actividad de la luciferasa.

Por último, los resultados de expresión de marcadores en la superficie celular obtenidos por el citómetro de la técnica h-CLAT, fueron procesados y representados en la Figura 8.



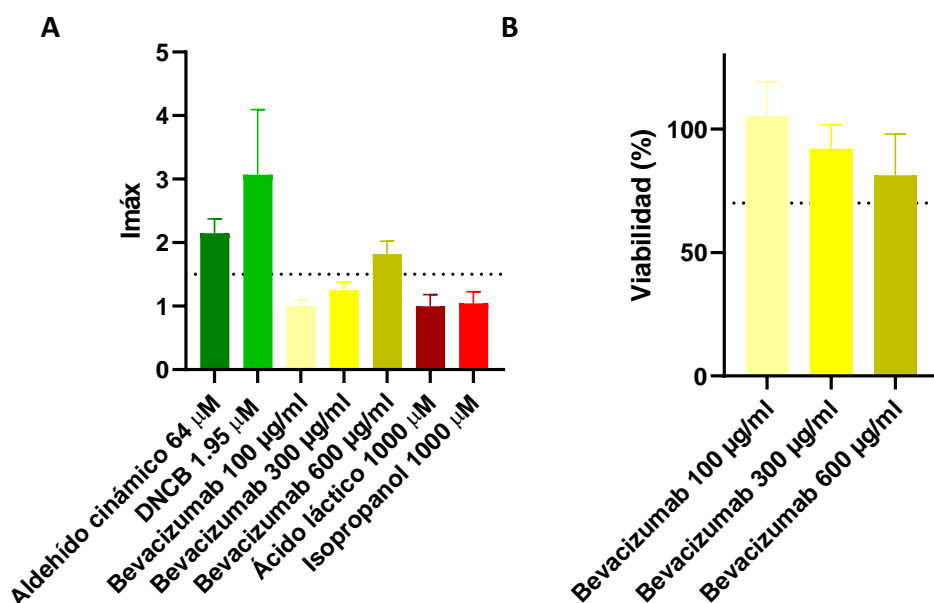
**Figura 9. Efectos de sunitinib sobre la línea celular de monocitos THP-1.** Representación de la expresión de los marcadores CD86 (A) y CD54 (B), así como de la viabilidad celular (C) tras 24 horas de incubación con sunitinib y los controles correspondientes: sulfato de níquel y DNCB como controles positivos y ácido láctico e isopropanol como controles negativos.

Tal y como se observa en la Figura 8A y 8B, sunitinib da resultados positivos para la técnica h-CLAT, ya que cumple que, en al menos una de las concentraciones la RFI supera el 150% para el CD86 y el 200% para el CD54. En este caso, la concentración que cumple con estos requisitos es la más alta, la de 500 ng/mL. Los datos de viabilidad celular ayudan en la corroboración, indicando que en ninguna de las tres concentraciones testadas sunitinib es un compuesto citotóxico para la línea celular THP-1. Además, al obtener un resultado positivo se calculó la EC150 de CD86 y la EC200 de CD54, obteniéndose unas concentraciones de 363,16 ng/mL y 76,11 ng/mL, respectivamente.

En el caso del sulfato de níquel y el DNCB, los valores de RFI fueron mayores del 300% para ambos marcadores de superficie y por lo tanto positivos para esta técnica. Por su parte, el ácido láctico y el isopropanol dieron resultados negativos.

#### 4.2. Bevacizumab

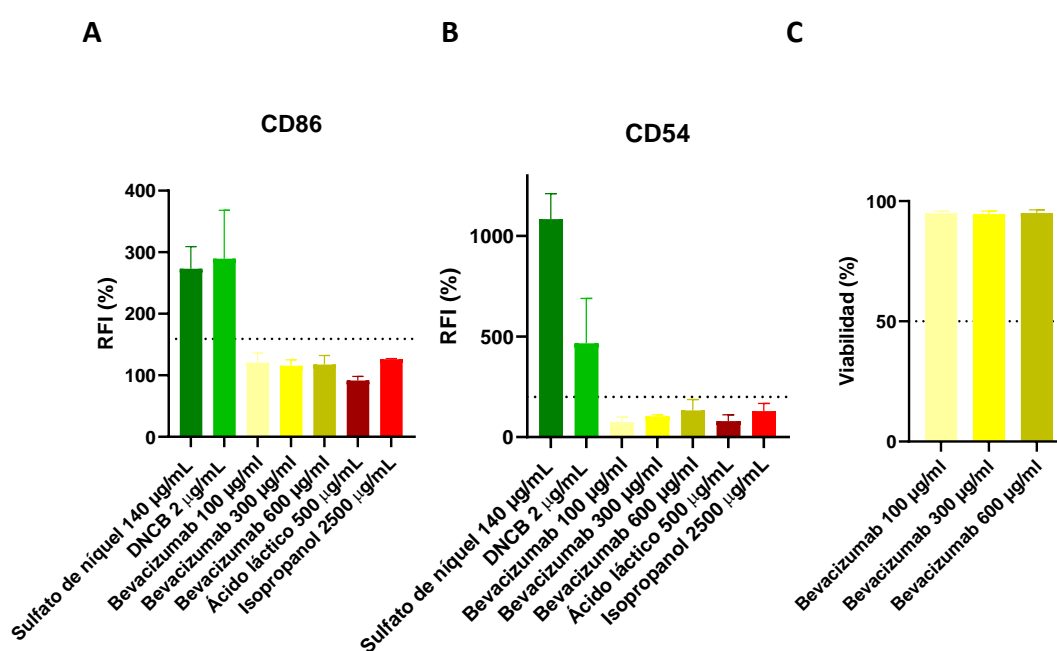
Una vez finalizados el ensayo de la actividad de la luciferasa y el MTT, se analizaron los datos y se representaron los valores de la  $I_{máx}$  obtenidos para cada concentración, así como los de viabilidad celular (Figura 9).



**Figura 10. Efectos de bevacizumab sobre la línea celular KeratinoSens.** Representación de la actividad de la luciferasa ( $I_{máx}$ ) (A) y de la viabilidad celular (B) tras 48 horas de incubación con bevacizumab, los controles positivos aldehído cinámico y DNCB, y los controles negativos 6-metilcoumarina y ácido láctico.

Como se puede observar en la Figura 9A, la predicción de la técnica KeratinoSens™ para bevacizumab es positiva, ya que para la concentración de 600 µg/mL obtenemos una Imáx de 1,82 (>1,5) siendo estadísticamente significativo con respecto al control. Además, se calculó el valor de la EC1.5, resultando una concentración de 454,31 µg/mL, así como la IC30, con un valor de concentración de 507,23 µg/mL. Además de esto, y de producirse un claro incremento dosis-respuesta, se puede ver como la viabilidad para la concentración de 600 µg/mL está por encima del 70% (Figura 9B). Los controles positivos, igual que en el caso de sunitinib, inducen en más de 1,5 veces la actividad luciferasa con respecto al control solvente, por lo que se consideran positivos. Como era de esperar, ocurre lo contrario en el caso del ácido láctico y del isopropanol, lo que valida la técnica.

Por último, la información obtenida en el citómetro con respecto a la técnica de h-CLAT, se puede ver recogida en la Figura 10.



**Figura 11. Efectos de bevacizumab sobre la línea celular de monocitos THP-1.** Representación de la expresión de los marcadores CD86 (A) y CD54 (B), así como de la viabilidad celular (C) tras 24 horas de incubación con bevacizumab y los controles correspondientes: sulfato de níquel y DNCB como controles positivos, y ácido láctico e isopropanol como controles negativos.

En este caso, se puede apreciar como en ninguna de las concentraciones se supera el umbral de la RFI para poder considerar el compuesto positivo, ni el 150% para el CD86 ni el 200% para el CD54, al igual que los controles negativos. No es el caso de los controles positivos, que dan valores de RFI > 150% en el caso de CD86 y > 200% en el caso de CD54, como se esperaba. La viabilidad celular es alta para las tres concentraciones de bevacizumab ensayadas.

## 5. DISCUSIÓN

La toxicidad cutánea asociada al tratamiento quimioterápico no es un efecto adverso que ponga en peligro la vida del paciente, pero sí que puede influir en la interrupción del tratamiento o en posibles reducciones en la dosis, así como también puede generar un impacto considerable en el bienestar tanto físico como psicológico del paciente (Lacouture et al., 2008). Son, por tanto, efectos secundarios importantes para tener en cuenta.

Durante este trabajo, se ha analizado el potencial para producir sensibilización cutánea de dos antineoplásicos empleados en la terapia antiangiogénica contra el cáncer, como son sunitinib y bevacizumab. En un futuro se pretende incorporar un tercer fármaco, un nuevo antineoplásico sin o con pocos estudios de sensibilización cutánea hasta el momento, que se encuentre en fase II o III de investigación. Para ello, se utilizaron tres técnicas *in chemico* e *in vitro* alternativas a la experimentación animal, cada una de ellas dirigida a un evento clave del proceso de sensibilización: DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT (OECD, 2018) (OECD, 2018) (OECD, 2019).

Cabe mencionar, que en la técnica de DPRA, al realizar las diluciones se observó que las concentraciones eran tan altas que se producían precipitaciones del compuesto, incompatibles con una columna HPLC. La solución fue bajar las concentraciones a testar, teniendo en cuenta que, como explica la OECD, si al bajar la concentración se obtiene un resultado positivo este puede ser utilizado en la caracterización del compuesto como sensibilizante, pero no para un resultado negativo, del cual no se pueden extraer conclusiones firmes. Esto solo se pudo aplicar con el péptido de cisteína, ya que, al reducir las concentraciones en el caso de la lisina, se seguían produciendo precipitados. Es por eso, que el modelo de predicción empleado fue únicamente el de la cisteína 1:10, posibilidad recogida en las normas de la OECD (OECD, 2019).

Si seguimos profundizando en la técnica de DPRA, encontramos otro aspecto para tener en cuenta. Las especificaciones de la OECD marcan el uso de una columna cromatográfica C-18 y de una fase móvil que permite la separación de péptidos en una muestra, pero la presencia de una matriz que contiene el anticuerpo monoclonal, con características químicas que favorecen interacciones hidrofóbicas fuertes entre el bevacizumab y la columna, dificulta mucho la determinación de la cisteína y la conservación en buen estado de la columna. Hay varias posibilidades que se podrían tener en cuenta para solucionar este problema. En primer lugar, realizar un paso previo de filtración por exclusión molecular, en el que separaríamos el anticuerpo de los péptidos que han quedado sin unir, siendo únicamente estos los que introduciríamos en la columna. Otra opción, sin tratamiento previo de la muestra, sería modificar por completo el método de HPLC (cambiar a una columna C8 y otra fase móvil) o incluso utilizar un espectrómetro de masas con inyección directa y sin columna. Esta última técnica, es de coste mucho más elevado, pero posee gran sensibilidad, y podría detectar y cuantificar los péptidos, sin que interfieran los anticuerpos. Cualquiera de las opciones supondría una modificación del protocolo marcado por la OECD, y, por tanto, requeriría de la puesta a punto de una nueva técnica inédita en nuestro laboratorio.

En el caso de sunitinib, los resultados obtenidos de las distintas técnicas proporcionan una predicción positiva, ya que, aunque para KeratinoSens™ da negativo, da positivo para dos de las tres técnicas, suficiente para considerar un compuesto como sensibilizante (OECD, 2017). Profundizando en el resultado positivo para la técnica h-CLAT, y gracias al cálculo de la EC150 de CD86 y la EC200 de CD54, se puede afirmar que sunitinib activa a las células dendríticas

produciéndose la consiguiente expresión de los marcadores de superficie a las concentraciones de 363,16 ng/mL y 76,11 ng/mL, respectivamente.

Este resultado negativo por parte de la técnica KeratinoSens™ se podría explicar gracias a la literatura científica, ya que varios estudios correlacionan el uso de sunitinib con la muerte queratinocítica, mediante varios mecanismos celulares como la inhibición de STAT3, importante en la supresión de la apoptosis (Yamamoto et al., 2014), o como el aumento de la proteína Fas y de su ligando, que llevaría a la muerte celular (Yeh et al., 2014). Esto podría explicar lo observado en la Figura 7B, ya que al aumentar la dosis de sunitinib a 500 ng/mL, la viabilidad de los queratinocitos disminuye. Esta disminución en la viabilidad en la concentración más alta de sunitinib explica el descenso en la luminiscencia, que se hace más notable en la concentración de 500 ng/mL.

La información facilitada por nuestro estudio, por tanto, concuerda con lo observado en la práctica clínica, debido a que todos los datos recopilados por parte tanto de la propia farmacéutica Pfizer como de los numerosos estudios clínicos realizados acerca de sunitinib, coinciden en que entre los efectos dermatológicos más recurrentes se encuentran el síndrome mano-pie, el *rash* o la dermatitis (Bar-Sela et al., 2010), reacciones que se pueden incluir dentro de la hipersensibilidad de tipo IV (Baldo y Pham, 2013).

Por otro lado, en cuanto a bevacizumab, los datos sugieren una cosa distinta. Teniendo en cuenta la limitación que supone no poder realizar la técnica de DPRA, nos encontramos con dos resultados opuestos. En primer lugar, la técnica de KeratinoSens™ nos proporciona una predicción positiva para el compuesto, mientras que la técnica de h-CLAT predice lo contrario, que bevacizumab no es un compuesto sensibilizante. Como consecuencia, al no tener una tercera técnica que lo confirme, consideramos a este fármaco como no sensibilizante.

Si dirigimos la mirada a la clínica, esta nos dice que bevacizumab no presenta tanta toxicidad cutánea como otros fármacos similares (Ara y Pastushenko, 2014). De hecho, un estudio realizado para investigar las reacciones de hipersensibilidad ocasionadas por anticuerpos, revela que la sensibilidad tardía o de tipo IV es la menos común entre los 16 anticuerpos testados, con una presencia de tan solo el 3%. Más concretamente, en este mismo ensayo se llevó a cabo una prueba cutánea a un paciente al cual se le administró bevacizumab, obteniéndose un resultado negativo (Isabwe et al., 2018).

Todo esto pone de manifiesto que el conjunto de técnicas alternativas al uso de modelos animales empleadas en este trabajo, tal y como se encuentran descritas ahora mismo en la OECD, no sería el más conveniente para evaluar la sensibilización cutánea de fármacos basados en anticuerpos monoclonales. Esto se debe a dos razones principalmente. Una de ellas es la imposibilidad de llevar a cabo la técnica DPRA. La segunda de las razones es que ya se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales no se caracterizan por producir reacciones de hipersensibilidad de tipo IV (Isabwe et al., 2018).

No obstante, resulta interesante la posibilidad de modificar el protocolo de la OECD para la técnica DPRA, en principio previsto para testar cosméticos, y abrir la puerta al desarrollo de nuevas metodologías más específicas que permitan evaluar la sensibilización cutánea de anticuerpos monoclonales.

Así pues, para respaldar y confirmar los resultados obtenidos en el estudio de la clasificación de ambos antineoplásicos, sería interesante llevar a cabo un modelo animal llamado *Lymph Node Proliferation Assay* (LNPA). Este modelo animal es idóneo para evaluar la hipersensibilidad

sistémica ocasionada por fármacos. Se trata de una modificación del LLNA, en el que el compuesto a testar ya no se aplica tópicamente, sino de manera subcutánea, favoreciendo la respuesta sistémica (Weaver et al., 2005).

Es difícil encontrar clasificaciones precisas de las reacciones de los distintos tipos de hipersensibilidad ante un fármaco, debido a la falta de investigación que proporcione las herramientas precisas para determinar exactamente el tipo de hipersensibilidad. El campo de los tratamientos quimioterápicos no es una excepción (Baldo y Pham, 2013). Así pues, el uso de estas técnicas *in chemico* e *in vitro*, además de reducir el número de animales en experimentación, puede ayudar en la clasificación precisa de la sensibilidad de tipo IV. Es importante predecir el nivel de afectación que producirán en los pacientes, de cara a preparar tratamientos adyuvantes a la quimioterapia, que contribuyan a mejorar la calidad de vida del paciente oncológico.

## 6. CONCLUSIONES

- La predicción mediante las técnicas *in chemico* e *in vitro* DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT, para el fármaco sunitinib es positiva, por lo tanto, este fármaco se considera como sensibilizante cutáneo.
- La predicción mediante las técnicas *in vitro* KeratinoSens™ y h-CLAT, para el fármaco bevacizumab es negativa, por lo que no se puede considerar dicho fármaco como sensibilizante cutáneo.
- Las técnicas *in chemico* e *in vitro* DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT son adecuadas para la evaluación del potencial sensibilizante de fármacos inhibidores multi-quinasa.
- Las técnicas *in vitro* KeratinoSens™ y h-CLAT han mostrado su validez para la evaluación del potencial sensibilizante de fármacos basados en anticuerpos monoclonales. En cambio, es necesario seguir investigando la técnica *in chemico* DPRA y desarrollar nuevas metodologías que permitan adecuarla para la evaluación del potencial sensibilizante de anticuerpos monoclonales



## 7. REFERENCIAS

- AIBA, S.; TERUNUMA, A.; MANOME, H.; Y TAGAMI, H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *European Journal of Immunology*, 27(11), 3031-3038. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271141>
- ALEJANDRO, A.; GARCÍA-BILBAO, A.; Y ARISTIMUÑO, C. (2014). Avances en la evaluación de la sensibilización dérmica mediante métodos alternativos | *Revista de Toxicología de AETOX*. <http://rev.aetox.es/wp/index.php/3122-4/>
- APTE, R. S.; CHEN, D. S.; Y FERRARA, N. (2019). Vegf in signaling and disease: Beyond discovery and development. *Cell*, 176(6), 1248-1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- AQUINO, M.; Y ROSNER, G. (2019). Systemic contact dermatitis. *Clinical Reviews in Allergy y Immunology*, 56(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8686-z>
- ARA, M.; Y PASTUSHENKO, E. (2014). Fármacos antiangiogénicos y piel: Efectos cutáneos adversos de sorafenib, sunitinib y bevacizumab. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 105(10), 900-912. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2014.02.010>
- ATKINS, M.; JONES, C. A.; Y KIRKPATRICK, P. (2006). Sunitinib maleate. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 279-280. <https://doi.org/10.1038/nrd2012>
- BAERISWYL, V.; Y CHRISTOFORI, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- BALDO, B. A.; Y PHAM, N. H. (2013). Adverse reactions to targeted and non-targeted chemotherapeutic drugs with emphasis on hypersensitivity responses and the invasive metastatic switch. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3), 723-761. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9447-3>
- BAR-SELA, G.; KEDEM, E.; HADAD, S.; POLLACK, S.; HAIM, N.; ATRASH, F.; Y SHAHAR, E. (2010). Successful desensitization protocol for hypersensitivity reaction caused by sunitinib in a patient with a gastrointestinal stromal tumor. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(2), 163-165. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp118>
- BOLOGNIA, J. L.; SCHAFFER, J. V.; Y CERRONI, L. (2018). *Dermatología*. Elsevier Health Sciences.
- CAO, Y.; E, G.; WANG, E.; PAL, K.; DUTTA, S. K.; BAR-SAGI, D.; Y MUKHOPADHYAY, D. (2012). Vegf exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Research*, 72(16), 3912-3918. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4058>
- CARDA, M. (2015). *Metodología Sintética Aplicada a la Síntesis de Fármacos*.
- CASATI, S.; WORTH, A.; AMCOFF, PATRIC; WHELAN, M., y Institute for Health and Consumer Protection. (2013). EURL ECVAM strategy for replacement of animal testing for skin sensitisation hazard identification and classification. Publications Office. <http://dx.publications.europa.eu/10.2788/84214>

CROSS, M. J.; DIXELIUS, J.; MATSUMOTO, T.; Y CLAEISSON-WELSH, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(9), 488-494. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00193-2)

DELBALDO, C.; FAIVRE, S.; DREYER, C.; Y RAYMOND, E. (2012). Sunitinib in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: Latest evidence and clinical potential. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4(1), 9-18. <https://doi.org/10.1177/1758834011428147>

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; Y LEVINE, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 7(1), 9-14. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>

FAIVRE, S.; DELBALDO, C.; VERA, K.; ROBERT, C.; LOZAHIC, S.; LASSAU, N.; BELLO, C.; DEPRIMO, S.; BREGA, N.; MASSIMINI, G.; ARMAND, J.-P.; SCIGALLA, P.; Y RAYMOND, E. (2006). Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(1), 25-35. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.2194>

FDA (2019). FDA approves sunitinib malate for adjuvant treatment of renal cell carcinoma. FDA. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-sunitinib-malate-adjuvant-treatment-renal-cell-carcinoma>

FERRARA, N.; GERBER, H.-P.; Y LECOATER, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>

FERRARA, N.; Y KERBEL, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967-974. <https://doi.org/10.1038/nature04483>

FOLDEVILA, C. (2004). El lugar en terapéutica de...Inhibidores de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. GH CONTINUADA. Septiembre-octubre 2004. VOL. 3 Nº5. Unidad de Cirugía Hepática y Trasplante. Instituto de Enfermedades Digestivas. IDIBAPS. Hospital Clínic de Barcelona. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

FOMBUENA, C. (2019). Puesta a punto de las técnicas de sensibilización cutánea: DPRA, KeratinoSens y h-CLAT. Trabajo Fin de Máster en Biotecnología Biomédica. Universitat Politècnica de València.

FRANK GERBERICK, G.; RYAN, C. A.; DEARMAN, R. J.; Y 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>

GOEL, H. L.; Y MERCURIO, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871-882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>

HANAHAH, D.; Y FOLKMAN, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353-364. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80108-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80108-7)

HANAHAH, D.; Y WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HUANG, L.; HUANG, Z.; BAI, Z.; XIE, R.; SUN, L.; Y LIN, K. (2012). Development and strategies of VEGFR-2/KDR inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*, 4(14), 1839-1852. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.121>

ISABWE, G. A. C.; GARCIA NEUER, M.; DE LAS VECILLAS SANCHEZ, L.; LYNCH, D.-M.; MARQUIS, K.; Y CASTELLS, M. (2018). Hypersensitivity reactions to therapeutic monoclonal antibodies: Phenotypes and endotypes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(1), 159-170.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.018>

KAPLAN, R. N.; RIBA, R. D.; ZACHAROULIS, S.; BRAMLEY, A. H.; VINCENT, L.; COSTA, C.; MACDONALD, D. D.; JIN, D. K.; SHIDO, K.; KERNS, S. A.; ZHU, Z.; HICKLIN, D.; WU, Y.; PORT, J. L.; ALTORKI, N.; PORT, E. R.; RUGGERO, D.; SHMELKOV, S. V.; JENSEN, K. K.; ... LYDEN, D. (2005). VEGFR1-positive hematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 438(7069), 820-827. <https://doi.org/10.1038/nature04186>

KARKKAINEN, M. J.; MÄKINEN, T.; Y ALITALO, K. (2002). Lymphatic endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biology*, 4(1), E2-5. <https://doi.org/10.1038/ncb0102-e2>

KIM, K. J.; LI, B.; HOUCK, K.; WINER, J.; Y FERRARA, N. (1992). The vascular endothelial growth factor proteins: Identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors*, 7(1), 53-64. <https://doi.org/10.3109/08977199209023937>

KIM, S.; DING, W.; ZHANG, L.; TIAN, W.; Y CHEN, S. (2014). Clinical response to sunitinib as a multitargeted tyrosine-kinase inhibitor (Tki) in solid cancers: A review of clinical trials. *OncoTargets and therapy*, 7, 719-728. <https://doi.org/10.2147/OTT.S61388>

KLEINSTREUER, N. C.; SULLIVAN, K.; ALLEN, D.; EDWARDS, S.; MENDRICK, D. L.; EMBRY, M.; MATHESON, J.; ROWLANDS, J. C.; MUNN, S.; MAULL, E.; Y CASEY, W. (2016). Adverse outcome pathways: From research to regulation scientific workshop report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 76, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.01.007>

KOLLMANNBERGER, C.; SOULIERES, D.; WONG, R.; SCALERA, A.; GASPO, R.; Y BJARNASON, G. (2007). Sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma: Recommendations for management of side effects. *Canadian Urological Association Journal*, 1(2 Suppl), S41-S54.

LACOUTURE, M. E.; WU, S.; ROBERT, C.; ATKINS, M. B.; KONG, H. H.; GUITART, J.; GARBE, C.; HAUSCHILD, A.; PUZANOV, I.; ALEXANDRESCU, D. T.; ANDERSON, R. T.; WOOD, L.; Y DUTCHER, J. P. (2008). Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *The Oncologist*, 13(9), 1001-1011. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2008-0131>

LEE, J.; KU, T.; YU, H.; CHONG, K.; RYU, S.-W.; CHOI, K.; Y CHOI, C. (2012). Blockade of VEGF-A suppresses tumor growth via inhibition of autocrine signaling through FAK and AKT. *Cancer Letters*, 318(2), 221-225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.014>

MAGNUSSON, B.; Y KLIGMAN, A. M. (1969). The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *The Journal of Investigative Dermatology*, 52(3), 268-276. <https://doi.org/10.1038/jid.1969.42>

MODI, S. J.; Y KULKARNI, V. M. (2019). Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-2)/kdr inhibitors: Medicinal chemistry perspective. *Medicine in Drug Discovery*, 2, 100009. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2019.100009>

MULLER, Y. A.; CHEN, Y.; CHRISTINGER, H. W.; LI, B.; CUNNINGHAM, B. C.; LOWMAN, H. B.; Y DE VOS, A. M. (1998). VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: Crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure*, 6(9), 1153-1167. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00116-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00116-6)

MUNOZ, I. G. (2019, enero 29). La Unión Europea, líder mundial en bienestar animal [Text]. España - European Commission. [https://ec.europa.eu/spain/news/20190213\\_%20The-European-Union-world-leader-in-animal-welfare\\_es](https://ec.europa.eu/spain/news/20190213_%20The-European-Union-world-leader-in-animal-welfare_es)

NATSCH, A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers—Functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 113(2), 284-292. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp228>

OECD (1992), Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070660-en>.

OECD (2010), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>.

OECD (2017), Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation, OECD Series on Testing and Assessment, No. 256, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264279285-en>.

OECD (2018), Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>.

OECD (2018), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>.

OECD (2019), Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229709-en>.

OLSSON, A.-K.; DIMBERG, A.; KREUGER, J.; Y CLAESSEON-WELSH, L. (2006). VEGF receptor signalling In control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(5), 359-371. <https://doi.org/10.1038/nrm1911>

PARKER, M. W.; GUO, H.-F.; LI, X.; LINKUGEL, A. D.; Y VANDER KOOI, C. W. (2012). Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors. *Biochemistry*, 51(47), 9437-9446. <https://doi.org/10.1021/bi3012143>

PATARD, J.-J.; RIOUX-LECLERCQ, N.; MASSON, D.; ZERROUKI, S.; JOUAN, F.; COLLET, N.; DUBOURG, C.; LOBEL, B.; DENIS, M.; Y FERGELOT, P. (2009). Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 101(8), 1417-1424. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605298>

PELLET-MANY, C.; FRANKEL, P.; JIA, H.; Y ZACHARY, I. (2008). Neuropilins: Structure, function and role in disease. *Biochemical Journal*, 411(2), 211-226. <https://doi.org/10.1042/BJ20071639>

PERROT-APPLANAT, M.; Y DI BENEDETTO, M. (2012). Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: Adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adhesion y Migration*, 6(6), 547-553. <https://doi.org/10.4161/cam.23332>

- POPRACH, A.; PAVLIK, T.; MELICHAR, B.; PUZANOV, I.; DUSEK, L.; BORTLICEK, Z.; VYZULA, R.; ABRAHAMOVA, J.; Y BUCHLER, T. (2012). Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: A national registry-based study. *Annals of Oncology*, 23(12), 3137-3143. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds145>
- PRESTA, L. G.; CHEN, H.; O'CONNOR, S. J.; CHISHOLM, V.; MENG, Y. G.; KRUMMEN, L.; WINKLER, M.; Y FERRARA, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Research*, 57(20), 4593-4599.
- PRICE, T.; KIM, T. W.; LI, J.; CASCINU, S.; RUFF, P.; SURESH, A. S.; THOMAS, A.; TJULANDIN, S.; GUAN, X.; Y PEETERS, M. (2016). Final results and outcomes by prior bevacizumab exposure, skin toxicity, and hypomagnesaemia from ASPECCT: Randomized phase 3 non-inferiority study of panitumumab versus cetuximab in chemorefractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 68, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.08.010>
- RINI, B. I.; PLIMACK, E. R.; STUS, V.; GAFANOV, R.; HAWKINS, R.; NOSOV, D.; POULIOT, F.; ALEKSEEV, B.; SOULIÈRES, D.; MELICHAR, B.; VYNNYCHENKO, I.; KRZYZHANIVSKA, A.; BONDARENKO, I.; AZEVEDO, S. J.; BORCHIPELLINI, D.; SZCZYLIK, C.; MARKUS, M.; MCDERMOTT, R. S.; BEDKE, J.; ... KEYNOTE-426 INVESTIGATORS. (2019). Pembrolizumab plus axitinib versus sunitinib for advanced renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 380(12), 1116-1127. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1816714>
- ROA, I. (2018). Basic concepts in tumor angiogenesis. *International Journal of Medical and Surgical Sciences*, 1(2), 129-138. <https://doi.org/10.32457/ijmss.2014.016>
- SANDLER, A.; GRAY, R.; PERRY, M. C.; BRAHMER, J.; SCHILLER, J. H.; DOWLATI, A.; LILENBAUM, R.; Y JOHNSON, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542-2550. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>
- SAWANO, A.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, S.; AONUMA, M.; Y SHIBUYA, M. (1996). Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth y Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2), 213-221.
- SERRA, E.; Y PUIG, L. (2011). Dermatitis de contacto alérgica. Revisión. *Farmacia Profesional*, 25(5), 40-44.
- SHIBUYA, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (Vegf) and its receptor (Vegfr) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes y Cancer*, 2(12), 1097-1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>
- SIMKENS, L. H. J.; VAN TINTEREN, H.; MAY, A.; TEN TIJE, A. J.; CREEMERS, G.-J. M.; LOOSVELD, O. J. L.; DE JONGH, F. E.; ERDKAMP, F. L. G.; ERJAVEC, Z.; VAN DER TORREN, A. M. E.; TOL, J.; BRAUN, H. J. J.; NIEBOER, P.; VAN DER HOEVEN, J. J. M.; HAASJES, J. G.; JANSEN, R. L. H.; WALSH, J.; CATS, A.; DERLEYN, V. A.; ... KOOPMAN, M. (2015). Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab in metastatic colorectal cancer (Cairo3): A phase 3 randomised controlled trial of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Lancet (London, England)*, 385(9980), 1843-1852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62004-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62004-3)

- SOUSA, F.; CRUZ, A.; FONTE, P.; PINTO, I. M.; NEVES-PETERSEN, M. T.; Y SARMENTO, B. (2017). A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03959-4>
- STRICKLAND, J.; ZANG, Q.; KLEINSTREUER, N.; PARIS, M.; LEHMANN, D. M.; CHOKSI, N.; MATHESON, J.; JACOBS, A.; LOWIT, A.; ALLEN, D.; Y 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>
- SUN, L.; LIANG, C.; SHIRAZIAN, S.; ZHOU, Y.; MILLER, T.; CUI, J.; FUKUDA, J. Y.; CHU, J.-Y.; NEMATALLA, A.; WANG, X.; CHEN, H.; SISTLA, A.; LUU, T. C.; TANG, F.; WEI, J.; Y TANG, C. (2003). Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(7), 1116-1119. <https://doi.org/10.1021/jm0204183>
- TALMADGE, J. E.; Y FIDLER, I. J. (2010). Aacr centennial series: The biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Research*, 70(14), 5649-5669. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>
- TENNSTEDT, D.; HERMAN, A.; Y BAECK, M. (2019). Dermatitis alérgica de contacto. *EMC - Dermatología*, 53(1), 1-24. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(19\)41713-5](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(19)41713-5)
- UE (2003). Directiva 2003/15/CE del parlamento europeo y del consejo, de 27 de febrero de 2003, por la que se modifica la Directiva 76/768/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de productos cosméticos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/15/oj>
- UE (2009). Reglamento (CE) n o 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- UE (2018). Pruebas de cosméticos en animales: hacia una prohibición mundial, de 21 de enero de 2018. Ref.: 20180216STO98005. Consultado el 20 de abril de 2020; disponible en: <https://www.europarl.europa.eu/news/es/headlines/society/20180216STO98005/pruebas-de-cosmeticos-en-animales-hacia-una-prohibicion-mundial>
- VINKEN, M. (2013). The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology*, 312, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.011>
- WEAVER, J. L.; CHAPDELAINE, J. M.; DESCOTES, J.; GERMOLEC, D.; HOLSAPPLE, M.; HOUSE, R.; LEBREC, H.; MEADE, J.; PIETERS, R.; HASTINGS, K. L.; Y DEAN, J. H. (2005). Evaluation of a lymph node proliferation assay for its ability to detect pharmaceuticals with potential to cause immune-mediated drug reactions. *Journal of Immunotoxicology*, 2(1), 11-20. <https://doi.org/10.1080/15476910590930100>
- YAMAMOTO, K.; MIZUMOTO, A.; NISHIMURA, K.; UDA, A.; MUKAI, A.; YAMASHITA, K.; KUME, M.; MAKIMOTO, H.; BITO, T.; NISHIGORI, C.; NAKAGAWA, T.; HIRANO, T.; Y HIRAI, M. (2014). Association of toxicity of sorafenib and sunitinib for human keratinocytes with inhibition of signal transduction and activator of transcription 3(Stat3). *PLoS ONE*, 9(7), e102110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102110>

YEH, C.-N.; CHUNG, W.-H.; SU, S.-C.; CHEN, Y.-Y.; CHENG, C.-T.; LIN, Y.-L.; CHANG, W.-C.; CHUNG-YEE HUI, R.; CHIANG, K.-C.; CHEN, T.-W.; JAN, Y.-Y.; CHEN, C.-W.; CHEN, T.-J.; YANG, C.-H.; Y HUNG, S.-I. (2014). Fas/fas ligand mediates keratinocyte death in sunitinib-induced hand-foot skin reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(11), 2768-2775. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.218>

#### **Referencias de figuras:**

Figura 1: BOLOGNIA, J. L.; SCHAFFER, J. V.; & CERRONI, L. (2018). *Dermatología*. Elsevier Health Sciences.

Figura 4: GOEL, H. L.; Y MERCURIO, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 871-882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>.

Figura 5: ATKINS, M.; JONES, C. A.; Y KIRKPATRICK, P. (2006). Sunitinib maleate. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(4), 279-280. <https://doi.org/10.1038/nrd2012>