

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA**



**CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL  
SENSIBILIZANTE CUTÁNEO DE MOLÉCULAS  
DE TERAPIA ONCOLÓGICA DIRIGIDA MEDIANTE  
TÉCNICAS IN-VITRO**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Antonio García Molina

Dirigida por:

Dr. D Javier Milara Paya

Dr. D Julio Cortijo Moreno

MAYO 2023

VALENCIA





*Doctorado en Biomedicina y Farmacia*

D. Julio Cortijo Gimeno, Catedrático y Javier Milara Payá,  
Profesor Asociado de la Universitat de València,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por el Ldo. **ANTONIO GARCIA MOLINA**, titulado “Caracterización del potencial sensibilizante cutáneo de moléculas de terapia oncológica dirigida mediante técnicas in-vitro”, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado:

en Valencia, mayo 2023

Julio Cortijo Gimeno

Javier Milara Paya





# **AGRADECIMIENTOS**



*Cuando un proyecto llega a su fin se puede observar con perspectiva el camino recorrido hasta llegar a tal punto. Este proyecto de tesis doctoral es un buen ejemplo de ello y a pesar de sentirme profundamente feliz y satisfecho del trabajo realizado y el objetivo cumplido, soy consciente que en un futuro cuando mire hacia atrás y recuerde mi tesis doctoral perdurará en mi mente el camino recorrido y las personas que han contribuido a que salga adelante y por eso quiero reflejar mi agradecimiento y felicidad de habérmelos cruzado en el camino.*

*En primer lugar, agradecer a Julio Cortijo por su apoyo y dirección durante todo el proyecto y a Javier Milara por crearme el interés en este mundo de la investigación por su brillante carrera y por proponerme el proyecto durante un saliente de guardia que amanecí motivado. Tras proponer mi interés en descubrir sus líneas de trabajo, inmediatamente y sin preguntar si me había quitado las legañas subimos a conocer el laboratorio de farmacología de la facultad de medicina y a conocer a la gente que trabajaba allí. Y en este punto, es dónde este proyecto sale adelante y el pilar que ha sustentado todo el proyecto y me refiero a las personas del "labteam", que desde el primer momento me acogieron como uno más, me explicaron y ayudaron a entender todos los procedimientos y lo más importante me descubrieron que una tesis son momentos de trabajo y momentos de disfrute tanto dentro como fuera del laboratorio. En especial y a pesar de todas sus pullitas quiero agradecer a Inés, Pilar y Paula que han tenido que apadrinarme como alumno prodigio para enseñarme lo poco que sé y que han sido incluso más importantes en este proyecto que el mismo autor. Pero no quiero dejar sin mencionar al resto del equipo: Cris, Amparo y Martín, aunque no*

*coincidió con él en el laboratorio, fuera de él ha sido tan importante como el resto. Y es que, lo que me llevo de esta experiencia además de los conocimientos son los montepis, las bachatas, el snow con sus talones y sus puntas y algún que otro cachondeo con los huevos y no fritos precisamente. Y esto último me hace mencionar al último integrante del "labteam" y que no es precisamente científico pero que como reportero del paciente 0 se ganó un puesto, Héctor, espero una calabaza como regalo. Por vosotros el camino ha merecido la pena y el llegar al objetivo es la guinda y es el mejor momento para agradecer a la ciencia haberos conocido.*

*Que la tesis es un camino duro es bien sabido, pero especialmente lo ha sido por las condiciones externas a la misma; una pandemia, momentos en los que la salud, que tanto nos motiva para investigar, nos abre los ojos y nos cambia para siempre y momentos de dudas en los que no se ve el fin del camino y dan ganas de tirar la toalla. Recordar todo esto me hace sentir orgulloso de estar ahora en esta situación y recordar a todas las personas que han estado en el proceso apoyándome. Indudablemente, mis padres y mi hermana, aunque muchas veces desde la distancia siempre tenían ese ánimo y te dan ese gas tan sólo con preguntarte ¿cómo va la tesis? Y mi respuesta casi siempre; bueno... poco a poco. Pues poco a poco he llegado y me siento feliz porque ellos siempre confían en mí y aunque yo dudase seguro que ellos no. Estoy donde estoy gracias a ellos y cada logro en mi vida será motivo de orgullo porque es en parte suyo.*

*Otro apoyo indudable durante el camino ha sido el servicio de farmacia del hospital clínico de Valencia, dónde he desarrollado paralelamente mi formación y trabajo residente de*

*farmacia hospitalaria y que ha sido la fuente de financiación del pan de cada día. En especial a todos mis residentes Álvaro, Pili, Rubén, María y el pisha (Álvaro2). Habéis sido mi día a día durante 4 años y ahora que lo veo con perspectiva y desde fuera echo de menos los cafés, las conversaciones a pie de la re-ensasadora y ¡hasta las etiquetas de la nutrición parenteral! A todos los adjuntos que tantos conocimientos me han aportado, de la farmacia y de la vida en general y es que... ¡que dura es la vida del trabajador! Y Por supuesto a todo el equipo de enfermería y de auxiliares que recordaré con cariño siempre. Espero que algún día nos volvamos a cruzar en el camino, quizás más pronto que tarde...*

*Por último, no por menos importante, si no por llegar a última hora, tengo que agradecer a Diana por aguantarme y apoyarme durante este último tramo del camino. Gracias por mirar aquella foto y fijarte en un farmacéutico (a veces existimos) y bueno el resto ya lo conocemos. Stayhomas, Fuerteventura y Londres forman parte del camino de esta tesis. No menciono todo porque se excedería del ámbito científico pero en tu cabeza y en la mía quedan. La siguiente eres tú y espero estar ahí para apoyarte. PD: Quiero una foto vintage para el recuerdo.*



# ÍNDICE





1. INTRODUCCIÓN .....	25
1.1. Reacciones de hipersensibilidad .....	27
1.1.1. Hipersensibilidad inmediata o tipo I .....	28
1.1.2. Hipersensibilidad citotóxica dependiente de anticuerpo o tipo II .....	35
1.1.3. Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos o tipo III .....	38
1.1.4. Hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T o tipo IV .....	42
1.1.4.1. Dermatitis de contacto alérgica .....	42
1.1.4.2. Dermatitis de contacto sistémica .....	49
1.1.4.3. Dermatitis de contacto irritativa.....	50
1.2. Relación estructura química hipersensibilidad .....	51
1.2.1. Dominios estructurales y sensibilización cutánea. Análisis SAR .....	51
1.2.1.1. Aceptores de Michael .....	52
1.2.1.2. Electrófilos Sn2 .....	60
1.2.1.3. Electrófilos SnAr.....	64
1.2.1.4. Formadores de base de Schiff.....	65
1.2.1.5. Agentes acilantes .....	68
1.2.1.6. Compuestos no reactivos.....	70
1.2.1.7. Casos especiales.....	71
1.2.2. Análisis Relación Estructura Actividad Cuantitativo (QSAR) .....	72
1.3. Fármacos y reacciones de hipersensibilidad.....	80
1.4. Terapia oncológica dirigida. Fármacos anti-tirosina kinasa (tki).....	85
1.4.1. ERBB/EGFR/HER tirosina kinasas .....	86
1.4.1.1. Familia erbB y cáncer .....	89
1.4.1.1.1. Cáncer de pulmón.....	89
1.4.1.1.2. Cáncer de mama .....	91
1.4.1.1.3. Otros tipos de Cáncer .....	94
1.4.2. Familia de receptores VEGF .....	95
1.4.3. Proteína quinasa BCR-ABL1 .....	98
1.4.4. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR .....	102
1.4.4.1. Implicaciones de la vía PIK3/AKT/mTOR en cáncer .....	105
1.4.5 Inhibición PARp.....	107
1.4.6. Ciclinas dependientes de quinasa 4 y 6 (CDK4/6).....	109

1.4.6.1 Desarrollo preclínico de inhibidores CDK4/6.....	111
1.4.7. TAXANOS.....	112
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....	113
2.1. HIPÓTESIS.....	115
2.2. OBJETIVOS.....	116
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	117
3.1. MATERIALES.....	119
3.1.1. Reactivos control .....	119
3.1.2. Antineoplásicos.....	119
3.2. METODOS .....	121
3.2.1. Ensayos DPRA (Direct-Peptide-Reactivity-Assay) .....	121
3.2.2. KERATINOSENS™ .....	123
3.3.3. Ensayo MTT en queratinocitos en monocapa .....	125
3.3.4. Ensayo h-CLAT (Human cell line activation test) .....	126
3.3.5. Silenciamiento de VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 .....	128
3.3.6. Análisis SAR y predicción QSAR.....	129
4. RESULTADOS.....	135
4.1. Resultados de las técnicas de sensibilización cutánea .....	137
4.1.1. La inhibición de EGFR no tiene potencial sensibilizante .....	137
4.1.2. Los inhibidores del BCR-ABL tienen potencial sensibilizante.....	139
4.1.3. Los inhibidores VEGFR tienen potencial efecto sensibilizante de grupo .....	141
4.1.4. Los inhibidores PARP no mostraron potencial de sensibilización cutánea.....	144
4.1.5. Los inhibidores de ciclinas CD4/6 no tienen potencial de sensibilización dérmica ni toxicidad en queratinocitos .....	144
4.1.6. Los inhibidores de PIK3 reportan resultados negativos para sensibilización cutánea pero con potencial citotóxico en queratinocitos.....	146
4.1.7. Los inhibidores de mTOR no son sensibilizantes cutáneos.....	146
4.1.8. Los taxanos tienen elevado potencial de sensibilización cutánea .....	148
4.1.9. La inhibición de VEGFR1 provoca selectivamente sensibilización cutánea .....	150
4.2. Análisis SAR y predicción de sensibilización cutánea con QSAR toolbox.....	151
4.2.1. Fármacos antiEGFR .....	151
4.2.2. Fármacos inhibidores del BCR-ABL .....	152

4.2.3. Fármacos inhibidores de VEGFR .....	153
4.2.4. Fármacos inhibidores de PARP .....	155
4.2.5. Fármacos inhibidores de mTOR .....	156
4.2.6. Fármacos inhibidores de PI3K.....	157
4.2.7. Fármacos inhibidores de ciclinas .....	158
4.2.8. Taxanos .....	159
5. DISCUSION .....	163
6. CONCLUSIONES.....	175
7. BIBLIOGRAFIA .....	179
8. ABREVIATURAS .....	201
9. ANEXOS.....	209



# ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1.</b> Mecanismos inmunológicos en la hipersensibilidad tipo I.....	29
<b>Figura 2.</b> Diferencia en la respuesta inmunológica entre la exposición oral temprana y la exposición dérmica.....	31
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la cascada de señalización intracelular en la activación de mastocitos .....	33
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de las reacciones de hipersensibilidad tipo III .....	39
<b>Figura 5.</b> (a) Interacción entre una célula presentadora de antígenos y un linfocito T. Se muestran las señales estimulante e inhibidora. (b) Interacción LinfocitoT-Linfocito B mediante el MHC-TCR y la señal CD40-CD40L .....	41
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de sensibilización y provocación de la hipersensibilidad de tipo IV [45] .....	45
<b>Figura 7.</b> Mecanismos moleculares de estrés oxidativo y respuesta innata implicados en el desarrollo de la dermatitis de contacto .....	47
<b>Figura 8.</b> Reacción típica de adición de Michael .....	53
<b>Figura 9.</b> Pre-aceptores de Michel que se activan mediante oxidación. ....	54
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de reacción tipo aceptor de Michel de una $\beta$ -dicetona en medio básico.....	54
<b>Figura 11.</b> Dominios estructurales tipo aceptor de Michael .....	58
<b>Figura 12.</b> Mecanismos de interacción de proteínas nucleófilas con electrófilos Sn2 oxofílicos.....	63
<b>Figura 13.</b> Electrófilos Sn2 sulfurados .....	64
<b>Figura 14.</b> Electrófilos SnAr .....	64
<b>Figura 15.</b> Mecanismo de reacción SnAr del DNCB con nucleófilos.....	64
<b>Figura 16.</b> Relación sensibilización/electrofilia de compuestos aromáticos halogenados [76] .....	65
<b>Figura 17.</b> Posibles mecanismos de descomposición de la base de Schiff del benzaldehído. ....	67
<b>Figura 18.</b> Atranol y cloroatranol .....	68
<b>Figura 19.</b> Mecanismo de reacción de los agentes acilantes mediante un intermediario tetraédrico .....	68
<b>Figura 20.</b> Estructura química de la oxazolona y el resto de alquil azlactonas .....	70
<b>Figura 21.</b> Mecanismo de reacción con nucleófilos del clotrimazol mediante sustitución nucleofílica Sn1.....	72
<b>Figura 22.</b> Relación RAI vs Sensibilización cutánea. ....	76
<b>Figura 23.</b> Familias de receptores tirosina kinasa.....	85
<b>Figura 24.</b> Familia de receptores ERBB/HER/EGFR. ....	86
<b>Figura 25.</b> Mecanismos de regulación tardía de EGFR.....	88
<b>Figura 26.</b> Principales mutaciones del EGFR implicadas en el desarrollo de cáncer de pulmón .....	91

<b>Figura 27.</b> Mecanismos de inducción de tumorigenesis mediados por sobreexpresión de HER2 .....	93
<b>Figura 28.</b> Funciones de los receptores de VEGFR (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) e interacción con las distintas isoformas de VEGF.....	97
<b>Figura 29.</b> Representación esquemática de los genes ABL1 y BCR y de la proteína BCR-ABL1 quinasa. . . . .	99
<b>Figura 30.</b> Actividad relativa de los inhibidores del BCR-ABL frente algunas quinasa. Los colores muestran el porcentaje de inhibición . . . . .	100
<b>Figura 31.</b> Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR .....	103
<b>Figura 32.</b> Vías de señalización de mTOR1 y mTOR2 .....	103
<b>Figura 33.</b> Componentes de los complejos mTOR1 y mTOR2 .....	104
<b>Figura 34.</b> Procesos de acumulación de poli(ADP-ribosa) y degradación de PAR.....	108
<b>Figura 35.</b> Modo de acción de los inhibidores de PARP en quimiosensibilización y radiosensibilización .....	109
<b>Figura 36.</b> Papel de CDK4/6 en la regulación del ciclo celular .....	110
<b>Figura 37.</b> Inducción de la expresión de la luciferasa en la línea celular keratinoSens® .. .	124
<b>Figura 38.</b> Silenciamiento génico mediante ARN interferente. ....	129
<b>Figura 39.</b> Módulo “profiling” de QSAR toolbox. ....	131
<b>Figura 40.</b> Módulo “data” de QSAR toolbox.....	132
<b>Figura 41.</b> Ejemplo del resultado de la predicción por análogos de QSAR toolbox.....	133
<b>Figura 42.</b> Los inhibidores de EGFR no inducen hipersensibilidad retardada. ....	138
<b>Figura 43.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de inhibidores BCR-ABL.....	140
<b>Figura 44.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de bevacizumab mediante KeratinoSens™ y h-CLAT.....	142
<b>Figura 45.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de inhibidores de VEGFR; sunitinib, regorafenib y sorafenib mediante las técnicas DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT.....	143
<b>Figura 46.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de olaparib y palbociclib.. ....	145
<b>Figura 47.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de everolimus y alpelisib.....	147
<b>Figura 48.</b> Análisis de hipersensibilidad retardada de taxanos; paclitaxel y docetaxel.. ....	149
<b>Figura 49.</b> siRNA-VEGFR1 induce hipersensibilidad retardada. ....	150



# ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1:</b> Tipos de reacciones de hipersensibilidad, mecanismos y ejemplos .....	28
<b>Tabla 2.</b> Principales mediadores de mastocitos y síntomas asociados .....	34
<b>Tabla 3.</b> Enfermedades producidas por autoanticuerpos específicos frente a tejidos.....	36
<b>Tabla 4.</b> Auto-antígenos patogénicos en LES Haga clic o pulse aquí para escribir texto. ....	41
<b>Tabla 5.</b> Compuestos con dominio tipo aceptor de Michael.. .....	57
<b>Tabla 6.</b> Dominios Sn2. *polar-H.....	61
<b>Tabla 7.</b> Electrófilos Sn2 oxofílicos. IS: índice de estimulación .....	62
<b>Tabla 8.</b> Compuestos formadores de base de Schiff f .....	66
<b>Tabla 9.</b> Agentes acilantes.....	69
<b>Tabla 10.</b> Agentes no reactivos testados como positivos en LLNA. ....	71
<b>Tabla 11.</b> Compuestos incluidos en el apartado casos especiales y su posible mecanismo de acción.....	72
<b>Tabla 12.</b> Exactitud, sensibilidad, especificidad y tasas de falsos negativos y positivos del punto de fusión (PF) y tensión superficial (TS).....	75
<b>Tabla 13.</b> Descriptores utilizados por Dearden JC, et al. [81] para desarrollar ecuaciones QSAR en función del mecanismo de acción. ....	79
<b>Tabla 14.</b> Clasificación de los descriptores en modelos de estructura-actividad .....	80
<b>Tabla 15.</b> Clasificación de las RAM .....	81
<b>Tabla 16.</b> Procedencia de los pacientes con alergia a medicamentos .....	82
<b>Tabla 17.</b> Especialidades remitentes de pacientes por alergia a medicamentos. ....	82
<b>Tabla 18</b> Medicamentos más habituales causantes de reacciones de hipersensibilidad. ....	84
<b>Tabla 19.</b> Alteraciones genéticas más frecuentes en CPCNP (adenocarcinoma y cáncer de célula escamosa) y en cáncer de pulmón microcítico .....	91
<b>Tabla 20.</b> Clasificación y características moleculares del cáncer de mama. ....	92
<b>Tabla 21.</b> Perfil de RAMs de los inhibidores del BCR-ABL .....	102
<b>Tabla 22.</b> Reactivos control utilizados.....	119
<b>Tabla 23.</b> Antineoplásicos utilizados. ....	120
<b>Tabla 24.</b> Modelo predictivo de cisteína en DPRA. ....	123
<b>Tabla 25.</b> Análisis SAR de erlotinib mediante QSAR toolbox. ....	152
<b>Tabla 26.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de imatinib, dasatinib y nilotinib..	153
<b>Tabla 27.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de sunitinib, sorafenib y regorafenib. ....	155
<b>Tabla 28.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de olaparib. ....	156
<b>Tabla 29.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de everolimus.. ....	157
<b>Tabla 30 .</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de alpelisib. ....	158
<b>Tabla 31.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de palbociclib.....	159
<b>Tabla 32.</b> Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de palbociclib.....	161



# **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1.Reacciones de hipersensibilidad.

Las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad se caracterizan por una respuesta exagerada del sistema inmune ante un determinado estímulo que en condiciones normales sería inocuo[1]. En la década de 1870, Charles Blackley observó que la exposición al polen era la causa de la fiebre del heno[2]. Sin embargo, es en 1907 cuando von Pirquet introduce el término alergia definido como una respuesta inusual y desproporcionada del organismo ante una sustancia inocua para la mayoría de individuos[3]. Combs y Gell[4], propusieron en 1963 una clasificación de las reacciones de hipersensibilidad en función del mecanismo fisiopatológico y molecular, describiendo 4 tipos:

<b>Tipo de hipersensibilidad</b>	<b>Mediador inmunológico</b>	<b>Mecanismo inmunológico</b>	<b>Cuadros clínicos</b>
<b>Hipersensibilidad inmediata: Tipo I</b>	IgE	Mastocitos y sus mediadores (aminas, citoquinas)	<i>Anafilaxia Asma Rinitis alérgica Angioedema Alergia alimentaria Reacciones dérmicas</i>
<b>Hipersensibilidad dependiente de anticuerpo o citotóxica: Tipo II</b>	IgM o IgG	Opsonización y fagocitosis celular Activación de neutrófilos y macrófagos Alteración de las funciones celulares	<i>Eritroblastosis fetal Síndrome de Goodpasture Anemias y trombocitopenias autoinmunes</i>
<b>Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos: Tipo III</b>	Inmunocomplejos formados por Ac e IgM o IgG	Reclutamiento y activación de leucocitos mediados por complemento y fracción constante (Fc)	<i>Lupus Eritematoso Sistémico Enfermedad del suero Reacción de Arthus</i>

<b>Hipersensibilidad mediada por linfocitos T: Tipo IV</b>	Linfocitos T, monocitos/macrófagos	Activación de macrófagos y liberación de citoquinas Muerte directa de la célula diana	<i>Dermatitis de contacto</i> <i>Reacción a la tuberculina</i> <i>Rechazo crónico de trasplante</i>
--	------------------------------------	--	---

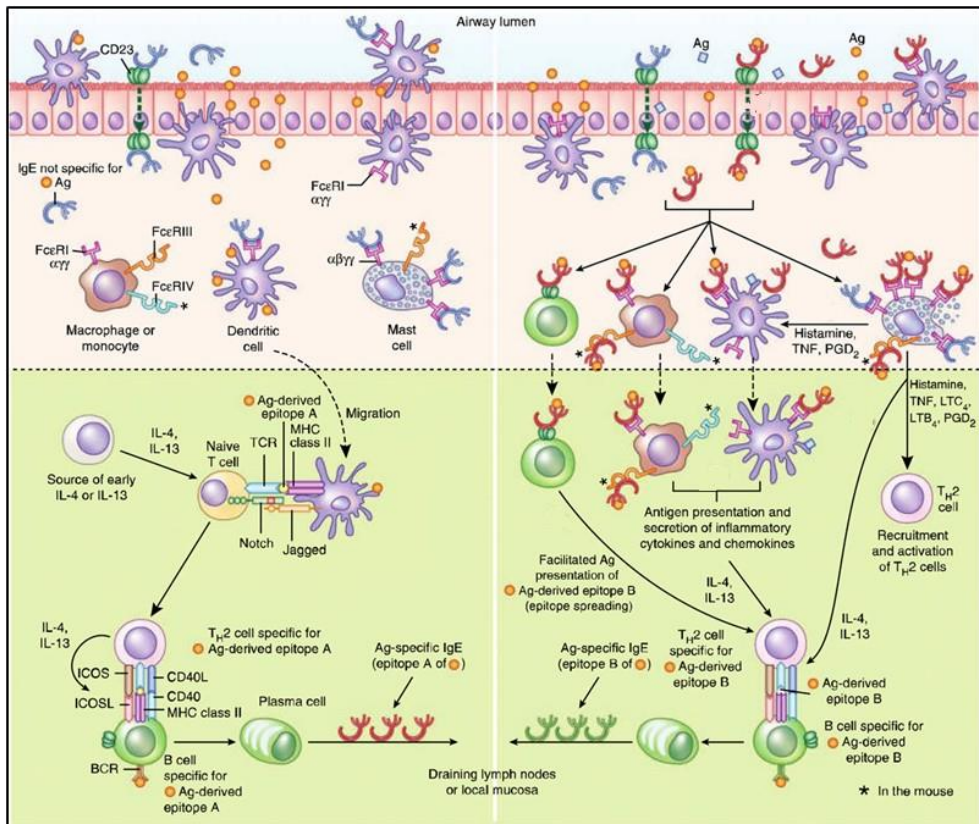
**Tabla 1:** Tipos de reacciones de hipersensibilidad, mecanismos y ejemplos

### 1.1.1. Hipersensibilidad inmediata o tipo I

La inmunoglobulina E (IgE) tiene un papel fundamental en el desarrollo de las reacciones de hipersensibilidad tipo I o atópicas. Existen dos tipos de receptores para la fracción constante (Fc) de la IgE; El RI de la Fc épsilon (FcεRI) se localiza principalmente en mastocitos y basófilos y su activación provoca la liberación de citoquinas. Por otro lado, el RII de la Fc épsilon (FcεRII o CD23) se encuentra en linfocitos B, monocitos y eosinófilos y tiene menor afinidad por la Fc de la IgE que el RI[5,6]. La producción de IgE específica requiere de una primera fase de sensibilización en la que el antígeno es reconocido y procesado por una célula presentadora de antígenos (CPA) como células dendríticas o linfocitos B. Estas células son capaces de interactuar con los linfocitos T naive mediante la interacción MHC-II y el TCR y en presencia de IL-4 e IL-13 se produce la diferenciación hacia el fenotipo Th2. El último paso para la generación de IgE específica es el reconocimiento del epítipo por el linfocito B y la producción específica de IgE que es estimulada por la presencia de IL-4 e IL-13. Tras un segundo contacto con el antígeno se produce la fase de provocación, en la cual la IgE específica circulante forma agregados Ag-Ac y se une al FcεRI provocando la desgranulación de mastocitos lo que conlleva la liberación de mediadores como histamina, PGD-2 y TNF-α. La IgE circulante y los agregados Ag-IgE pueden penetrar en el tejido epitelial mediante CD23 por transcitosis, lo cual potencia la cascada inflamatoria y la producción de IL-4 e IL-13. También se produce la activación de células dendríticas, lo cual conlleva la activación de linfocitos B y la generación de IgE específica frente



a nuevos epítomos, potenciando así la reacción inflamatoria a nivel local (Fig1)[7]. La interacción IgE-FcεRI en los mastocitos es clave en el mecanismo fisiopatológico de la hipersensibilidad de tipo I. Esta unión es la responsable de los síntomas de la alergia en función del lugar anatómico donde se produzca; rinitis (nariz), asma (a nivel pulmonar), alergias alimentarias (intestino) o reacciones cutáneas (piel). Así como, reacciones anafilácticas cuando la vía de exposición es la vía parenteral [8].



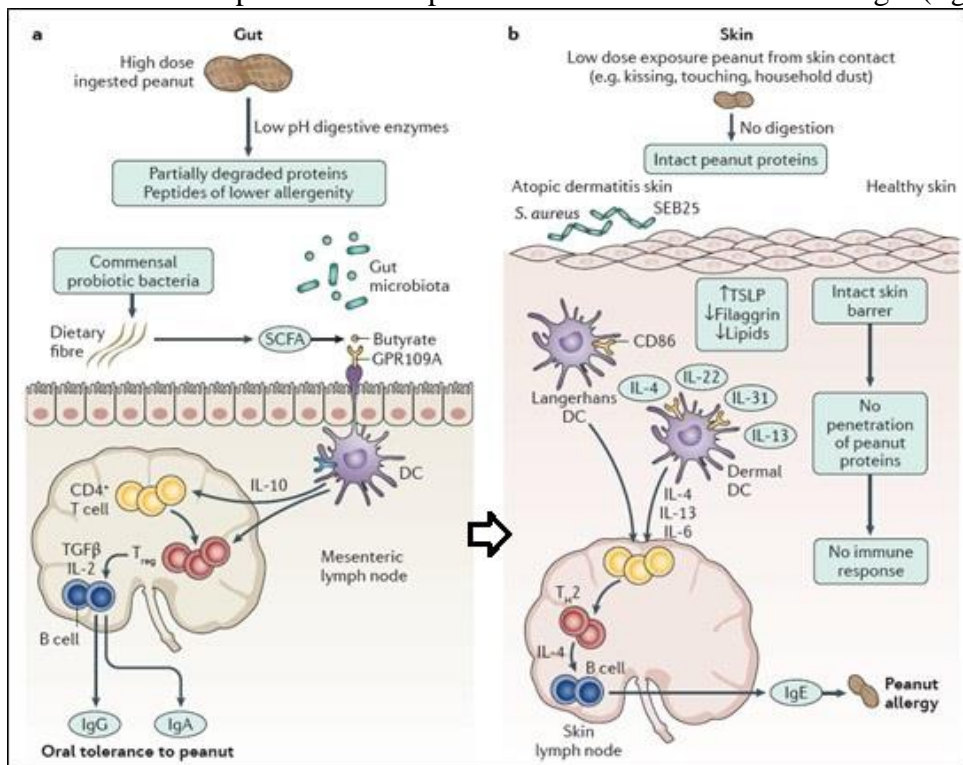
**Figura 1. Mecanismos inmunológicos en la hipersensibilidad tipo I. Fase de sensibilización (izq) y fase de amplificación (dcha). Modificado de Gould HJ**

A nivel respiratorio, se ha observado la presencia de FcεRI en células del epitelio bronquial en pacientes asmáticos frente a pacientes no asmáticos[9]. CD23 también está presente en la superficie de las células epiteliales bronquiales[10] cuya expresión es estimulada por IL-4 y facilita la transcitosis de IgE tanto libre como en forma de inmunocomplejo Ag-IgE. Este último, además, es capaz de provocar la desgranulación de mastocitos, contribuyendo al mecanismo patogénico del asma alérgico[11]. El receptor CD23 a nivel del epitelio respiratorio juega un papel importante como desencadenante del asma alérgico, ya que en ratones “knock-out” para el gen CD23 epitelial hay un aumento significativo tanto de IgE como de marcadores inflamatorios, por lo que se propone como una potencial diana terapéutica[12]. Dentro de la fisiopatología del asma existen varios fenotipos; el asma alérgico, caracterizado por un fenotipo Th2 con aumento de citoquinas tipo 2 como IL-4, IL-5 e IL-13. Por otro lado, existe un fenotipo no alérgico denominado asma intrínseco o neutrofílico, que se caracteriza por una respuesta tipo Th1 y Th17 dominante y elevación de IL-17, IL-21 e IL-22. El asma neutrofílico no es inducido por alérgenos, aunque hay factores desencadenantes como procesos infecciosos, el tabaco o la polución y se caracteriza por presentar un aumento de neutrófilos en las vías respiratorias. Este patrón se correlaciona con una mayor resistencia al tratamiento con corticoides y mayor severidad en el cuadro clínico[13,14]. Además, en el asma neutrofílico se ha evidenciado una mayor expresión del inflamosoma NLRP3 y de IL-1β, por lo que esta vía podría tener importancia en el desarrollo del asma no alérgico[15,16].

El mecanismo fisiopatológico sobre la alergia a nivel gastrointestinal es más controvertido. No obstante, la alergia alimentaria se define como una reacción de hipersensibilidad mediada por IgE cuya sintomatología se evidencia de manera inmediata tras el contacto con el alérgeno. Esta sintomatología es variada y puede involucrar a varios órganos; síntomas cutáneos, gastrointestinales, a nivel orofaríngeo y respiratorio[17]. A pesar de ello, no está bien establecido donde se producen las

## INTRODUCCIÓN

células B-IgE<sup>+</sup> y las diferencias en los niveles de IgE entre individuos con alergia alimentaria y sin ella. Varias investigaciones apuntan a la producción de IgE específica a nivel local intestinal mediante “Class Switch Recombination” de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> a IgE. También parece haber intercambio IgA hacia IgE y viceversa. Además, la IgA tiene importancia en la regulación de la microbiota intestinal, la cual también influye en el desarrollo de alergia alimentaria[18,19]. La exposición temprana a través de la piel en sujetos con dermatitis atópica es un factor que induce la sensibilización a antígenos alimentarios antes de ingerirlos. La exposición a cremas que contienen cacahuate en niños con dermatitis atópica supone un riesgo para desarrollar alergia alimentaria posteriormente. Además, la exposición temprana al alérgeno vía digestiva de estos individuos supone un factor protector en el desarrollo de la alergia (fig2)[19]



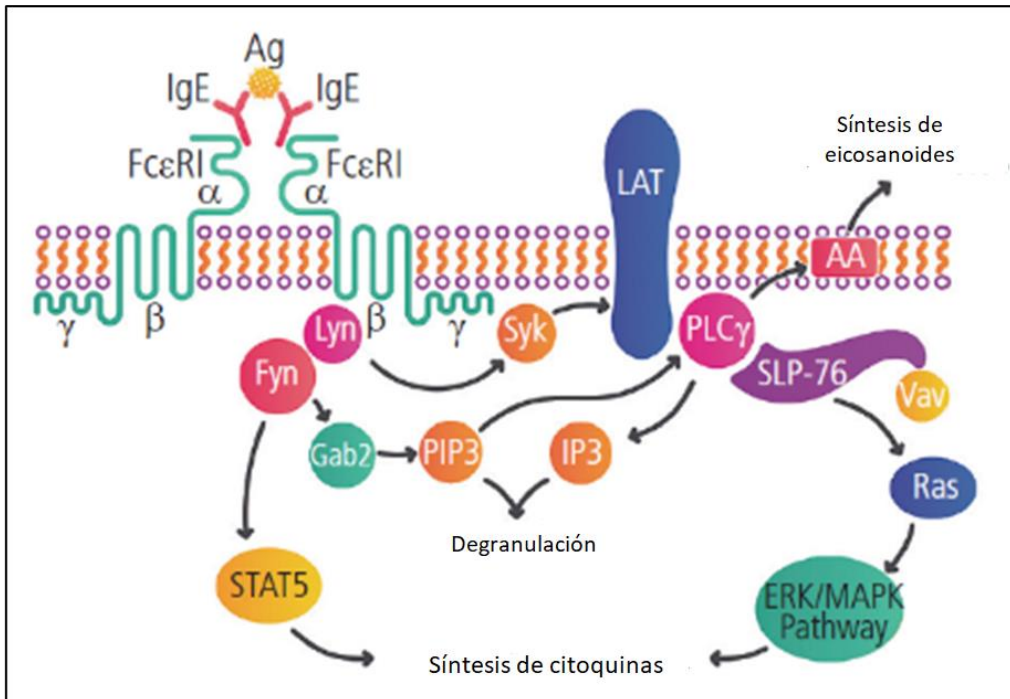
**Figura 2.** Diferencia en la respuesta inmunológica entre la exposición oral temprana (a) y la exposición dérmica tanto en individuos sanos como en individuos con dermatitis atópica, en los cuales se produce la sensibilización y la alergia alimentaria (b). Se muestra alergia al cacahuate como ejemplo. Modificado de Nowak-Wegrzyn A.

A nivel dérmico, un individuo que presenta hipersensibilidad frente a un determinado alérgeno y ha sido previamente sensibilizado desarrollará una reacción alérgica inmediata caracterizada por la presencia de habones y eritema en respuesta a la exposición intradérmica del alérgeno. Esta reacción inmediata se debe a la unión de IgE específica a los mastocitos tisulares dérmicos que liberan sus mediadores inflamatorios, principalmente histamina. Esta última provoca la liberación de NO, PGI<sub>2</sub> y PAF, mediante su unión a los receptores H1 de células endoteliales. Esta reacción provoca un aumento de la permeabilidad vascular, extravasación y entumecimiento desarrollando el típico habón rodeado de una zona eritematosa. Esta reacción inmediata cutánea (2-4h) se produce por el mecanismo típico desarrollado previamente, con una fase previa de sensibilización y activación de células Th2 y posterior activación de mastocitos mediante la unión FcεRI e IgE [1]. Además de esta fase inmediata, existen reacciones alérgicas tardías (4-24h) que pueden precederse de la reacción alérgica típica inmediata o no. Este tipo de reacción se produce por la liberación de citoquinas de mastocitos; entre ellas TNF-α, que induce la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria como selectina E y molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1). Los infiltrados característicos de esta reacción son con predominio de macrófagos y linfocitos Th1[1,20]

- Activación de mastocitos

La activación a nivel molecular de mastocitos depende de la unión de IgE a su receptor FcεRI en la superficie de los mastocitos. Este receptor se expresa en mastocitos y basófilos como un tetrámero αβγ<sub>2</sub>. También se expresa en forma trimérica αβ<sub>2</sub> en células presentadoras de antígenos, monocitos, eosinófilos y células del músculo liso esquelético. Las cadenas extracelulares α contienen los dominios de unión a IgE, mientras que en la porción intracelular (cadenas β y γ) es donde se localizan los motivos de señalización intracelular (ITAMs - immunoreceptor tyrosine-based

activation motifs)[8]. La fosforilación de los ITAMs ocurre mediante la participación de varias familias de tirosina quinasa (TK) (Fig3).



**Figura 3.** Representación esquemática de la cascada de señalización intracelular en la activación de mastocitos. Modificado de González-Deolano D

Primero intervienen Lyn una TK de la familia Src que se encuentra adyacente al FcεRI y fosforila la cadena β, induciendo así la fosforilación posterior de la cadena γ, que a su vez promueve la activación de una proteína TK de la familia ZAP-70 llamada Syk. Esta proteína es capaz de inducir la fosforilación de diferentes sustratos como el enlace para la activación de células T (LAT), SLP-76, Vav y la fosfolipasa Cγ (PLCγ). Una vez activadas, se desencadenan los estímulos intracelulares necesarios para la liberación de mediadores almacenados en el interior de los mastocitos, así como, la síntesis de citoquinas y la generación ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana. El proceso de activación se complementa con la fosforilación de la proteína Gab2, mediante la participación de otra TK de la familia Src llamada Fyn. Una vez fosforilada Gab2 estimula la generación de fosfatidilinositoltrifosfato (PIP3)

que induce el reclutamiento de moléculas como Btk y PLC $\gamma$  hacia la membrana celular. Finalmente, el aumento de calcio intracelular desencadena el proceso de desgranulación de los mastocitos[21]. La activación de mastocitos origina tres tipos de respuestas desencadenadas por distintos mediadores que se resumen en la tabla2[1,21]:

Tipo de mediador	Mediador	Sintoma/signo
Mediadores preformados	Histamina	Dolor de cabeza, hipotensión, urticaria, angioedema, prurito
	Triptasa	Activación endotelial asociada a reacción inflamatoria
	Quimasa	Hipertensión
	Proteoglicano (heparina)	Sangrado
Mediadores lípidicos	PAF	Edema pulmonar, urticaria, broncoconstricción, hipotensión
	PGD2	Secreción mucosa, broncoconstricción, inestabilidad vascular
	LTC4, LTD4 y LTE4	Secreción mucosa, broncocroscicción prolongada, inestabilidad vascular
Citoquinas	TNF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, GM-CSF, LIF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\delta$	Inducción de la inflamación
	IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-15, IL-16 IL-12, IFN- $\gamma$ IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF	Citoquinas Th2 Citoquinas Th1 Regulación de la inflamación y angiogenesis
Quimiocinas	CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL20 CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11	Reclutamiento de células efectoras y regulación de la respuesta inmune

**Tabla 2.** Principales mediadores de mastocitos y síntomas asociados

### 1.1.2. Hipersensibilidad citotóxica dependiente de anticuerpo o tipo II

En este tipo de reacciones se producen anticuerpos frente a antígenos celulares o de la matriz extracelular y afectan de manera específica a los tejidos que expresan estos antígenos. La mayoría de los casos se producen auto-anticuerpos y se pueden considerar síndromes autoinmunes. Sin embargo, a veces estos anticuerpos se generan frente a un antígeno extraño y provocan reacciones cruzadas con algún componente de los tejidos propios. Estos anticuerpos pueden causar daño principalmente por 3 vías: a) opsonización y fagocitosis: b) Inflamación mediada por Fc: los anticuerpos atraen a neutrófilos y macrófagos que se activan y provocan daño en los tejidos; c) Respuestas fisiológicas anómalas sin lesión celular o tisular: es el mecanismo de la enfermedad de Graves o de la miastenia gravis (Tabla 3)[1].

Enfermedad	Antígeno diana	Mecanismos de la enfermedad	Manifestaciones clínicas/histológicas
Anemia hemolítica autoinmunitaria	Proteínas de la membrana de eritrocitos	Opsonización y fagocitosis	Hemólisis, anemia
Púrpura trombocitopénica autoinmune	Proteínas de membrana de las plaquetas (GPIIb/IIIa)	Opsonización y fagocitosis	Hemorragias
Pénfigo vulgar	Proteínas de las uniones intercelulares de los queratinocitos (cadherina)	Pérdida de adhesiones intercelulares	Vesículas cutáneas
Síndrome de Goodpasture	Proteína no colágena de las membranas basales del glomérulo renal y de alveólos pulmonares	Inflamación mediada por el complemento y el receptor de Fc	Nefritis, hemorragias pulmonares



Miastenia gravis	Receptor de acetilcolina	Inhibición del receptor de acetilcolina por anticuerpos específicos	Debilidad muscular, parálisis
Enfermedad de Graves	Receptor TSH	Estimulación mediada por anticuerpos del receptor de TSH	Hipertiroidismo
Vasculitis	Proteínas de gránulos de neutrófilos	Desgranulación de neutrófilos	Vasculitis

**Tabla 3.** *Enfermedades producidas por autoanticuerpos específicos frente a tejidos*

A pesar de ser reacciones autoinmunes, este tipo de reacciones pueden estar desencadenadas por factores externos. Por ejemplo, la púrpura trombocitopénica autoinmune se asocia a infecciones por *Helicobacter pylori*[22] y del virus de la hepatitis C (VHC)[23]. Los mecanismos fisiopatológicos son todavía controvertidos. No obstante, existe un factor humoral responsable de la trombocitopenia mediado por IgG e IgM principalmente. Estos anticuerpos se generan frente a varios auto-antígenos, entre los que destaca la GPIIb/IIIa, que suponen el 75% de auto-anticuerpos. La presencia de auto-anticuerpos frente a esta glucoproteína da lugar al conocido como síndrome de Glanzmann. El 25% de anticuerpos restantes actúan frente a GPIb/IX GPIa, GPIIa y GPIV entre otros. El mecanismo de destrucción plaquetaria es mediante la opsonización y activación del complemento y posterior fagocitosis de las plaquetas[24]. Sin embargo, existe aproximadamente un 30% de pacientes en los cuales no se detectan auto-anticuerpos frente a auto-antígenos plaquetarios. En estos sujetos podría existir un mecanismo alternativo mediado por células T, que provocaría la lisis de las plaquetas[25]. Otro factor a tener en cuenta en la fisiopatología de esta enfermedad es la presencia de una trombopoyesis ineficaz, que daría lugar a una disfunción tanto cuantitativa como cualitativa de las plaquetas. En este sentido se han encontrado auto-anticuerpos frente al receptor de la trombopoyetina (TPO), el c-Mpl, en pacientes con purpura trombocitopénica



idiopática[26]. Estos auto-anticuerpos, se han encontrado además en pacientes que desarrollan trombocitopenias asociadas a otras enfermedades inmunológicas como la enfermedad de Still, el lupus eritematoso sistémico (LES) o la esclerosis múltiple[26–28]. La presencia de estos auto-anticuerpos anti-c-Mpl son la base del tratamiento con agonistas del receptor de trombopoyetina en pacientes refractarios a tratamiento con corticoides o inmunoglobulina, con respuestas de hasta el 80% [29].

En cuanto a los trastornos relacionados con la piel que se encuadran dentro de las reacciones de hipersensibilidad de tipo II se encuentra el pénfigo, que es una enfermedad caracterizada por la aparición de ampollas y la aparición a nivel histológico de acantolisis. El mecanismo es por la aparición de auto-anticuerpos frente a proteínas desmosómicas. La principal función de los desmosomas es el mantenimiento de las uniones intercelulares intraepidérmicas. En la etiología de la enfermedad intervienen factores genéticos y ambientales. Entre los factores genéticos se han vinculado algunas variantes alélicas del HLA de clase II. Respecto a los factores ambientales desencadenantes del pénfigo se encuentran fármacos, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas, quemaduras o infecciones[30]. Los fármacos implicados en la etiología del pénfigo se pueden agrupar en 3 categorías en función de sus características químicas; a) fármacos con grupo tiol (-SH), fármacos con grupo fenol, y c) fármacos sin grupos fenol ni tiol en su estructura. El mecanismo propuesto para los fármacos que contienen grupos tiol es la activación de enzimas, como el factor tisular activador de plasminogeno (t-PA) que provoca la desagregación de queratinocitos provocando la alteración de la adhesión tisular. Además, se alteran las uniones cisteína-cisteína por uniones tiol-cisteína, creando así neoantígenos y desencadenando una reacción inmunológica. La penicilamina es el fármaco de este tipo que con mayor frecuencia se ha asociado al desarrollo de pénfigo[31]. El grupo químico fenol también se ha relacionado con alteraciones dérmicas. Se ha observado una relación directa entre la toxicidad en queratinocitos y la hidrofobia de la molécula. Además de un aumento en la liberación de IL-1 $\alpha$  [32]. Como ejemplos de drogas sin

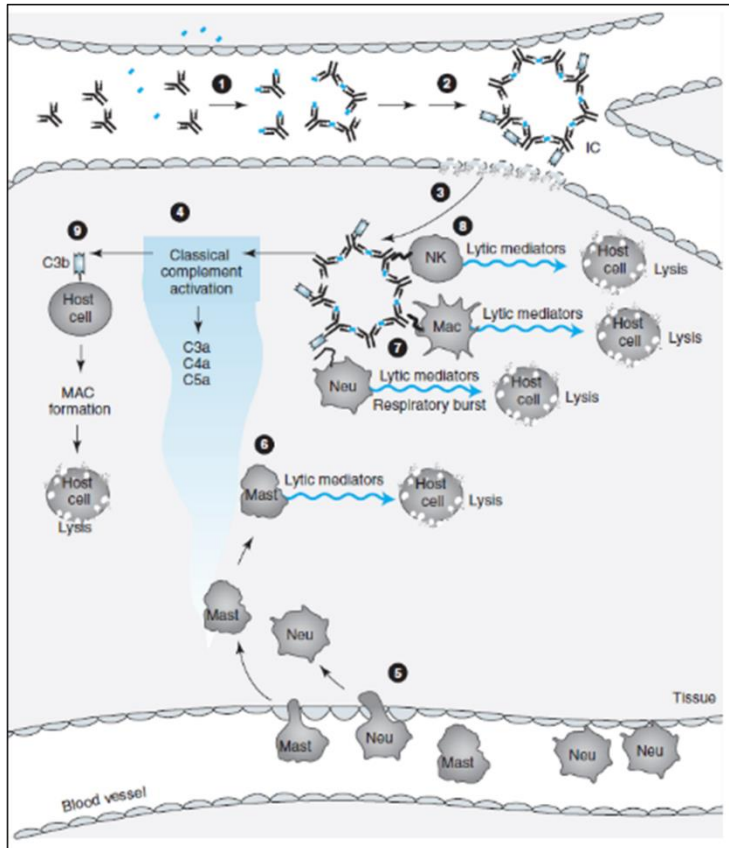
fenol ni tiol que se han relacionado con la aparición de pénfigo se encuentran algunos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) o glibenclamida[31].

La inmunidad humoral en el desarrollo del pénfigo es clave en el desarrollo de la enfermedad, como se demuestra mediante la aparición de acantolisis tras la incubación de piel sana con suero de pacientes con pénfigo, detectando además presencia de IgG específica en los espacios intercelulares[33]. En pacientes con pénfigo vulgar se ha observado linfocitos tanto Th1 como Th2 frente a la desmogleína 3, siendo los niveles de Th2 constantes en las fases agudas. Los linfocitos Th1 aumentan en la fase crónica de la enfermedad, indicando la participación de mecanismos celulares en la patogénesis del pénfigo[30].

### **1.1.3. Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos o tipo III**

A diferencia de las reacciones de hipersensibilidad de tipo II, en las reacciones mediadas por inmunocomplejos (IC) se generan anticuerpos (IgG o IgM) frente a antígenos solubles. Estos complejos Ag-Ac circulantes son demasiado grandes para ser fagocitados y se depositan en varias localizaciones anatómicas, habitualmente en las paredes de los vasos sanguíneos. La presencia de estos inmunocomplejos en el tejido desencadena respuestas inmunitarias que se caracterizan por acumulación de neutrófilos en tejido lesionado tras 4-6h de la exposición con el antígeno. Como se muestra en la figura 4, el primer paso es la reacción Ag-Ac en el torrente circulatorio, dando lugar a la formación de aglomerados de Ag-Ac o inmunocomplejos de gran tamaño que cuando llegan a vasos de pequeño calibre quedan atascados y forman depósitos de inmunocomplejo. Estos depósitos activan el complemento y mecanismos inflamatorios que dañan las células endoteliales, permitiendo el paso del IC al endotelio capilar, donde se produce la activación del complemento y la liberación de anafilotoxinas que reclutan mastocitos y neutrófilos. Las células tisulares sufren daños por varios mecanismos; en primer lugar, la desgranulación de mastocitos (6). Por otro

lado, las células NK y los neutrófilos liberan mediadores de lisis ya que son incapaces de fagocitar los IC por su gran tamaño (7 y 8). También se produce la lisis de células tisulares mediante la activación del complemento y la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC) (9)[34].



**Figura 4.** Mecanismo de las reacciones de hipersensibilidad tipo III. Modificado de Mak TW.

El lupus eritematoso sistémico es una entidad clínica que se engloba dentro de este tipo de reacciones mediadas por inmunocomplejos. Es una enfermedad que afecta a varios órganos y sistemas. Los síntomas cutáneos son muy frecuentes y se manifiestan en forma de rash malar, maculas eritematosas, urticaria o telangiectasia, entre otras[35]. También afecta a las articulaciones, provocando artralgias, que junto a las lesiones cutáneas son los síntomas de debut más frecuentes[36]. A nivel hematológico puede producir citopenias; leucopenia, linfopenia, trombocitopenia o anemia

hemolítica, así como casos de mielofibrosis[37]. Otra de las complicaciones más frecuentes, son las lesiones a nivel renal. Estas lesiones pueden aparecer a nivel glomerular, tubulointersticial, o microvascular. Las lesiones microvasculares son las más características y pueden desarrollarse por tres mecanismos principales: a) aterosclerosis: es el tipo de vasculopatía renal más frecuente en el lupus nefrítico. Existen anticuerpos anti-células endoteliales que aparecen en pacientes con LES que inducen un estado pro-inflamatorio y pro-adhesivo del endotelio vascular renal, con la consecuente adhesión de macrófagos y daño tisular. Además, existe un componente mediado por citoquinas que influyen en el daño vascular, como el IFN- $\alpha$  que tiene un efecto anti-angiogénico mediante la represión de VEGF-A. b) depósito de inmunocomplejos: El depósito de inmunocomplejos y componentes del complemento en las paredes del endotelio vascular contribuye al daño del endotelio microvascular. Los IC estimulan la expresión en la superficie celular del receptor de glicación avanzada (RAGE), la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), promoviendo así la adhesión leucocitaria al endotelio y favoreciendo el daño vascular. c) Microangiopatía trombótica: Esta forma de daño renal es multifactorial y se le atribuyen varios factores como el síndrome antifosfolípido, el sistema del complemento o fármacos[38].

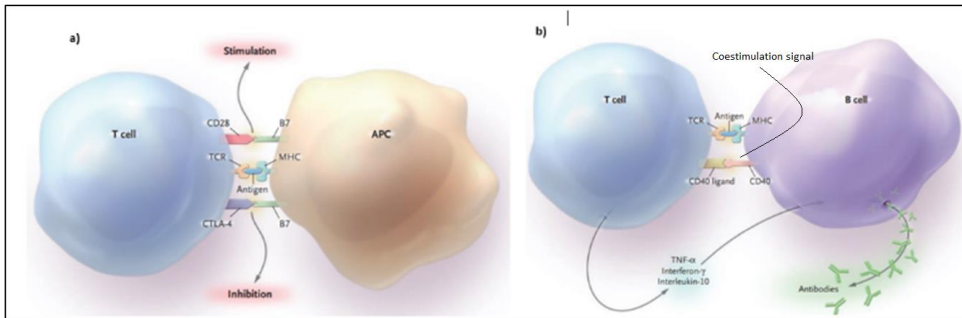
La patogenia de la enfermedad es multifactorial. El papel de los auto-anticuerpos es fundamental en el desarrollo de la enfermedad. Existen diferentes auto-antígenos que se han asociado a LES (Tabla 4)[39].

<b>Antígeno</b>	<b>Prevalencia</b>	<b>Efecto clínico principal</b>
ADN de doble cadena	70-80%	Enfermedad renal, enfermedad cutánea
Nucleosomas	60-90%	Enfermedad renal, enfermedad cutánea
Ro	30-40%	Enfermedad cutánea, enfermedad renal, problemas cardiacos fetales
La	15-20%	Problemas cardiacos fetales
Sm	10-30%	Enfermedad renal

Receptor NMDA	33-50%	Enfermedad cerebral
$\alpha$ -actina	20%	Enfermedad renal
Fosfolípidos	20-30%	Trombosis, aborto
C1q	40-50%	Enfermedad renal

**Tabla 4.** Auto-antígenos patogénicos en LES.

Los linfocitos T también tienen un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Fig5). Las células presentadoras de antígenos interactúan con células T naive como se muestra en la figura 5a. Si la señal predominante es la interacción CD28-B7, se producirá una señal estimulante que conllevará la activación del linfocito T. El bloqueo de esta interacción podría ser una estrategia terapéutica. Cuando se produce la interacción linfocito B – linfocito T (figura 5b) mediante la interacción CD40-CD40L se liberan una serie de citoquinas que estimulan la diferenciación del linfocito B y la producción de IgG autorreactiva[39].



**Figura 5.** (a) Interacción entre una célula presentadora de antígenos y un linfocito T. Se muestran las señales estimulante e inhibitoria. (b) Interacción Linfocito T-Linfocito B mediante el MHC-TCR y la señal CD40-CD40. Modificado de Rahman AL.

Los neutrófilos también parecen tener su importancia en la patogénesis del LES, mediante un proceso denominado NETosis[40]. Los NETs son un mecanismo alternativo a la fagocitosis de defensa frente a microorganismos de los neutrófilos. Consiste en la liberación de proteínas granulares como elastasa, catépsina G o mieloperoxidasa y elementos de la cromatina que forman agregados (NETs) que actúan frente a microorganismos[41]. Este proceso de formación de NETs es lo que

conocemos como NETosis. Se ha relacionado el aumento de la NETosis con el desarrollo de LES, ya que se han encontrado niveles aumentados de péptidos neutrofílicos como LL-37 en pacientes con LES. Estos péptidos activarían las células dendríticas plasmocitoides mediante el TLR y promueven de esta manera la liberación de IFN- $\alpha$ [40]. Además, la formación de NETs se asocia al desarrollo de autoinmunidad mediante varios mecanismos. Estos agregados extracelulares pueden actuar como fuente de antígenos que se asocian a enfermedades autoinunes como ADNdc, histonas, LL-37 o c1q. Además, los NETs pueden actuar como patrones asociados a daño molecular (DAMPs) que desencadenen una respuesta inflamatoria[42].

### **1.1.4. Hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T o tipo IV**

Las reacciones de hipersensibilidad tipo IV son reacciones de tipo retardado que están mediadas por linfocitos T. Se desarrollan mediante dos fases: a) sensibilización: en esta fase los precursores de linfocitos T CD4+ y CD8+ se activan en los ganglios linfáticos mediante la presentación de haptenos por CPA. b) provocación: Ante un segundo contacto con el alérgeno o hapteno se produce una reacción inflamatoria con migración de los linfocitos hacia el sitio de exposición[43]. La dermatitis de contacto es un tipo de reacción alérgica mediada por linfocitos T. No obstante, es importante diferenciar entre dermatitis de contacto alérgica e irritante.

#### **1.1.4.1. Dermatitis de contacto alérgica**

La dermatitis de contacto alérgica está desencadenada por sustancias químicas que actúan como alérgenos capaces de ser reconocidos por células de Langerhans que activarán a los linfocitos T. Hay muchas sustancias capaces de desencadenar este tipo de respuesta, que se denominan sensibilizantes cutáneos y se pueden diferenciar en varios tipos como; metales, alérgenos de origen biológico o moléculas orgánicas. Estos distintos tipos de alérgenos, aunque comparten parte de los procesos

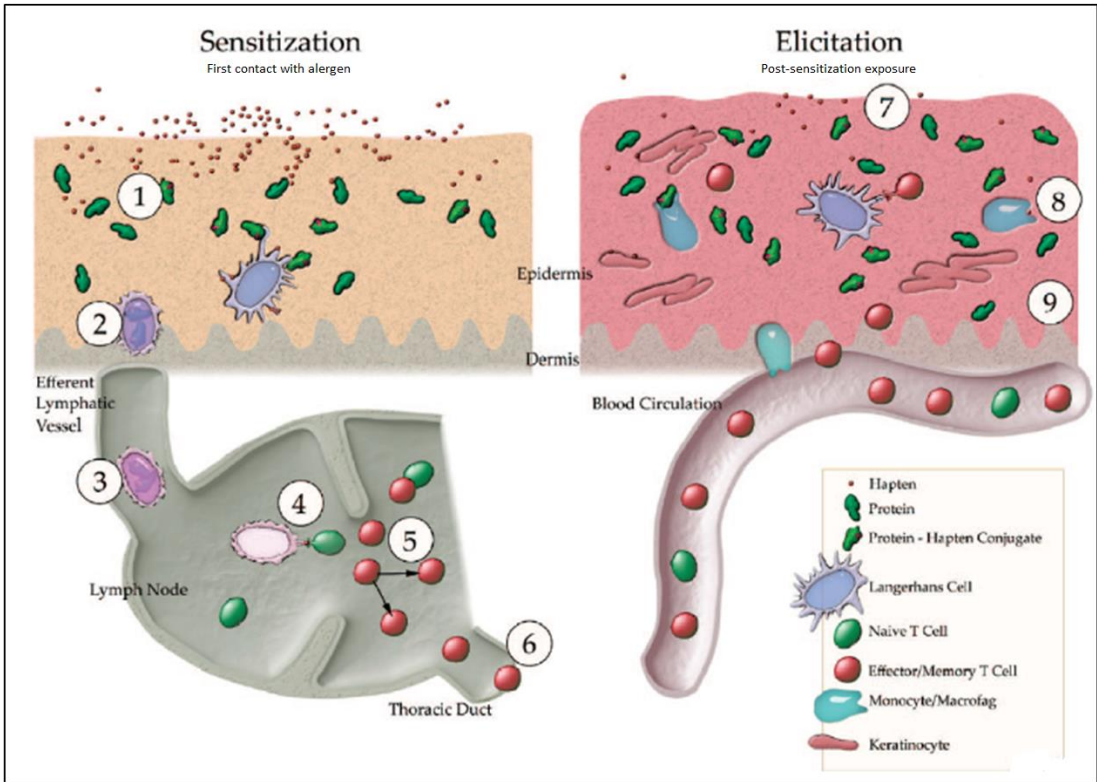
desarrollados en los mecanismos patogénicos, difieren en algunos otros. La OCDE ha propuesto los eventos clave que participan en el desarrollo de los sensibilizantes cutáneos de origen orgánico [44]:

1. **Interacción del alérgeno con proteínas de la epidermis:** En concreto se ha descrito la interacción con residuos de cisteína y lisina. Los compuestos químicos se comportan como haptenos que son capaces de interaccionar con las proteínas de la piel. Por lo tanto, el compuesto químico debe ser capaz de atravesar en cantidad suficiente el estrato corneo. Esta interacción es de tipo químico, en la cual, se produce un ataque nucleofílico de los grupos tiol (-SH) y amino (-NH<sub>2</sub>) de la cisteína y la lisina respectivamente. Por tanto, una característica esperable de los compuestos sensibilizantes es la presencia de grupos electrófilos.
2. **Respuesta inflamatoria del queratinocito:** Los haptenos también pueden interaccionar con proteínas del queratinocito. La entrada de un compuesto sensibilizante provoca múltiples efectos en el queratinocito, como la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. Además, un compuesto sensibilizante induce una respuesta antioxidante/electrófilo por la ruta ARE/EpRE. Se produce el desplazamiento de Keap-1, que en condiciones normales está unido a Nrf2, por el compuesto químico. Esto libera Nrf2 que viaja al núcleo y activa las vías ARE/EpRE.
3. **Activación de células dendríticas:** Las células dendríticas de la piel inmaduras, conocidas como células de Langerghans, son células presentadoras de antígenos, por lo que, son las encargadas de procesar antígenos e interactuar vía MHC-II con las células T naive. Este proceso de maduración de células dendríticas implica también cambios en la superficie celular, como la expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión (CD40, CD86 y CD11, CD54, respectivamente).

4. **Proliferación de Linfocitos T:** La dermatitis de contacto, es un proceso de hipersensibilidad tipo IV mediado por células T. Por tanto, el paso final es la activación de linfocitos T, mediante la presentación de antígenos en el MHC por las células dendríticas. Este paso se produce principalmente en los nódulos linfáticos, provocando la proliferación de linfocitos, lo cual establece la base del LLNA.

La dermatitis de contacto se produce cuando la vía de exposición del alérgeno es la vía tópica. Por tanto, las moléculas capaces de provocar este tipo de reacciones deben ser capaces de atravesar la barrera mecánica que supone el estrato córneo de la epidermis. Las moléculas más apropiadas por tanto son moléculas pequeñas (<500 D) y con una liposolubilidad adecuada ( $\log P \sim 2$ )[45]. La integridad del estrato corneo se relaciona con el aumento del potencial sensibilizante de las moléculas. Entre los factores que pueden influir se encuentran mutaciones en el gen de la filagrina, una molécula que se encuentra en los corneocitos y participa en la agregación de los mismos. Otro factor importante que potencia la sensibilización cutánea es la irritación de la piel. Muchos de los alérgenos sensibilizantes tienen potencial irritante [46]. Una vez que el alérgeno ha conseguido penetrar en la epidermis se produce la reacción de haptización que puede suceder con proteínas solubles y proteínas de membrana presentes en la superficie de las células de Langerhans. De esta manera el hapteno es reconocido por las células de Langerhans que migrarán a los nódulos linfáticos donde se produce la activación de células T naive. De esta manera se generan linfocitos T de memoria que quedan circulando en la sangre y los nódulos linfáticos. Cuando sucede el segundo contacto con la misma sustancia, estas células t de memoria son reclutadas en la zona de exposición y se inicia el proceso inflamatorio (Fig6)[45]





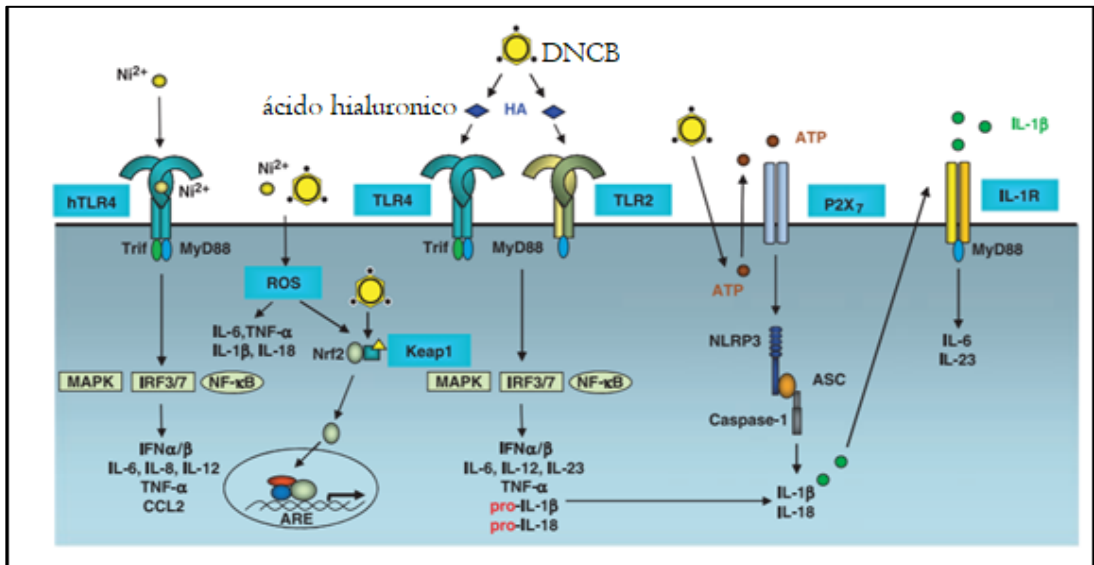
**Figura 6.** Mecanismos de sensibilización y provocación de la hipersensibilidad de tipo IV. Modificado de Kalberg AT.

Existen compuestos no sensibilizantes que mediante una reacción metabólica adquieren la capacidad de provocar sensibilización cutánea, denominados pre-haptenos. Esto es posible gracias a la capacidad metabólica de la piel, que es capaz de provocar reacciones de oxidación mediante el citocromo P450. La capacidad metabólica de la piel es mucho menor que la del hígado y por tanto las concentraciones que se alcanzan de los haptenos a nivel local son menores que cuando se incuban con microsomas hepáticos. Moléculas con dienos en su estructura son ejemplo de pre-haptenos que mediante la oxidación por los citocromos da lugar a epóxidos altamente electrófilos[47]. La respuesta inmune innata participa en el desarrollo de la dermatitis de contacto. Alérgenos como el níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) interaccionan con el TLR4, mientras que otros como el 2,4,6-trinitroclorobenceno (TNCB) activan los receptores TLR2/4

mediante la descomposición del ácido hialurónico. Además, el TNCB es capaz de inducir la activación del inflamosoma NLRP3 y la vía de las caspasas[48]. La vía del inflamosoma NLRP3 se activa mediante un aumento del ATP intracelular al activarse el receptor P2X<sub>7</sub>. Se ha demostrado resistencia a desarrollar dermatitis de contacto en un modelo animal con ausencia del gen P2X<sub>7</sub>[49]. La vía del inflamosoma NLRP3 ha demostrado su importancia en el desarrollo de la sensibilización cutánea, llegando a conseguir la tolerancia en compuestos altamente sensibilizantes como el DNCB mediante el bloqueo de esta vía[50].

Otro mecanismo de inducción de la inflamación que producen tanto el níquel como el TNCB es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS generadas inducen cambios conformacionales en una proteína citosólica denominada Keap1[51] (Fig7). Keap1 en ausencia de estrés oxidativo o electrofílico se encuentra unida al factor de transcripción Nrf2 y actúa como regulador negativo del mismo mediante la ubiquitinización y degradación de este por el proteasoma. En presencia de estrés oxidativo y/o compuestos electrofílicos Keap1 libera a Nrf2 que viaja al núcleo y desencadena la transcripción de genes de respuesta antioxidante[52]. Además, Nrf2 parece tener importancia en la regulación de la respuesta inflamatoria frente a compuestos sensibilizantes. En ratones “knock-out” para el gen Nrf2 se incrementa la respuesta tanto en el ensayo del nódulo linfático (LLNA) como en el test de engrosamiento de la oreja (MEST) en respuesta a varios sensibilizantes, tanto electrofílicos (DNCB o cinamaldehído) como el dioscianato de isoforona que es un sensibilizante que no reacciona con residuos de lisina y cisteína[53].

Los haptenos provocan señales tóxicas en las células epidérmicas lo que conlleva la activación y producción de mediadores inflamatorios; citoquinas, quimiocinas, nucleótidos, eicosanoides, ROS y proteínas de choque térmico. Esta cascada inflamatoria conlleva el reclutamiento y movilización de células dendríticas de la piel y otros leucocitos hacia los nódulos linfáticos y la consecuente activación de la inmunidad celular[54]. Las células de Langerhans se caracterizan por la presencia de langerina (CD207), aunque se encuentra también en células dendríticas de la dermis. El rol de las células de Langerhans en el desarrollo de la dermatitis de contacto mediante la migración a los nódulos linfáticos y la presentación de antígenos a linfocitos T ha sido objeto de debate. No obstante, parece que las responsables finales de esta migración y activación de linfocitos T son las células dendríticas de la dermis[55]. Existen dos subpoblaciones de células dendríticas dérmicas en función de la presencia o no de langerina, siendo las células dendríticas Langerina<sup>+</sup> las responsables de la presentación de antígenos y las implicadas en el mecanismo de la dermatitis de contacto[56].



**Figura 7.** Mecanismos moleculares de estrés oxidativo y respuesta innata implicados en el desarrollo de la dermatitis de contacto. Modificado de Ali Z.

La dermatitis de contacto es una reacción mediada por linfocitos T. No obstante, el perfil de la respuesta podría variar en función del alérgeno que produce la reacción, mostrando respuestas mayoritariamente Th1 y citoquinas de la inmunidad innata cuando el alérgeno es níquel. Por el contrario, otros alérgenos como los perfumes muestran un perfil de citoquinas de tipo Th2, Th22 y Th17 (FoxP3<sup>+</sup>)[57]. Metales como níquel o cromo muestran un perfil elevado de citoquinas Th1 y Th2 en comparación con sujetos control[58]. Además, el níquel también produce un aumento de IL-17 mediante la vía IL-23 activada por el TLR4 y mediante la cascada de señalización de JAK. Esto provoca un aumento de la expresión de ICAM-1 y el reclutamiento de células T no específicas de antígeno que contribuye a la amplificación del daño tisular[59].

El proceso de sensibilización es complejo, en el cual intervienen numerosas citoquinas y quimiocinas que promueven la migración de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> naive hacia los nódulos linfáticos, así como, las CPA. En los nódulos linfáticos (NL) se produce la interacción del TCR con MHCI y MHCII en linfocitos CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> respectivamente. En el proceso de migración hacia los NL participa aumentando la migración el receptor de quimiocinas CCR7 [60], mientras que CCR8 parece ser un regulador negativo en condiciones inflamatorias[61]. En la presentación de antígenos a los linfocitos T son necesarias 3 señales para la activación de los mismos. En primer lugar, es necesaria la interacción TCR-MHC. Tras esta interacción se produce la expresión de IL-2R y se produce la expansión clonal en presencia de IL-2. La tercera señal necesaria es dependiente del perfil de citoquinas de células dendríticas que va a definir la polarización celular; en presencia de IL-12 se estimula la formación de células efectoras, mientras que IL-10 promueve la formación de células T reguladoras. Un microambiente rico en IL-12 e IFN- $\gamma$  promueve la diferenciación hacia Th1 y Tc1, mientras que IL-6, TGF- $\beta$ , IL-21, IL-23 e IL-1 $\beta$  favorecen la polarización hacia Th17 y Th22. La presencia de IL-4 inducida por muchos alérgenos de contacto promueve el desarrollo hacia el fenotipo Th2[60].

La fase de provocación ocurre ante la re-exposición de individuo sensibilizado ante un hapteno. Los queratinocitos segregan quimiocinas que favorecen la quimiotaxis de células inflamatorias como CXCL9/10, CCL17, CCL20 y CCL27. Los linfocitos T penetran a través de la microvasculatura de la dermis. Esta migración puede producirse de manera específica promovida por el antígeno, pero la mayoría de linfocitos son reclutados de manera inespecífica gracias a la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión por los queratinocitos, células dendríticas, fibroblastos, mastocitos y células endoteliales. Los linfocitos migran por diapédesis hacia el lugar del foco inflamatorio mediado por células de adhesión como VCAM-1 y la selectina-E. Los principales efectores son los linfocitos CD8<sup>+</sup>, mientras que los CD4<sup>+</sup> asumen un papel regulador. También se produce la activación de células NK y la producción de IL-4 que conlleva la activación de linfocitos B y la producción específica de IgM. Esto activa el complemento y la formación de C5a, lo que conlleva la liberación de sustancias como serotonina y TNF de mastocitos y plaquetas. Finalmente, existe una fase de resolución en la que participan varios mecanismos como el aclaramiento del hapteno de la piel, mediante el aumento del flujo sanguíneo o la metabolización del hapteno[60].

### **1.1.4.2.Dermatitis de contacto sistémica**

La dermatitis de contacto clásica se considera una reacción mediante la aplicación tópica del alérgeno. Sin embargo, existe la posibilidad de desarrollar un cuadro similar cuando el alérgeno es expuesto mediante vía sistémica (vía oral, parenteral, inhalatoria, etc.) causando un cuadro de erupciones cutáneas en zonas de la piel que no han estado expuestas al alérgeno de manera tópica[62]. La reacción cutánea más específica de la dermatitis de contacto sistémica son reacciones de exacerbación en pacientes previamente sensibilizados. También se incluyen otras reacciones como eccema, erupciones, rash maculopapular y vasculitis. Un estudio clínico demostró la

aparición de reacciones cutáneas tras la exposición oral de níquel en pacientes sensibilizados frente a voluntarios sanos, así como, la relación significativa entre la dosis y la aparición de las reacciones cutáneas[63]. El mecanismo de este tipo de reacción también se considera dependiente de linfocitos. En pacientes con antecedentes de dermatitis sistémica de contacto al níquel se han encontrado fracciones significativamente mayores de células T de memoria CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (CD45RO<sup>+</sup>) que contienen el receptor de antígeno cutáneo asociado a linfocitos (CLA) que los pacientes sanos control no sensibilizados con níquel[64]. En este mismo estudio se observó una disminución de estas células T de memoria cuando los pacientes sensibilizados se exponen a níquel por vía oral, lo que sugiere una migración linfocítica hacia la piel provocando el daño cutáneo. El níquel ha sido el elemento más utilizado para estudiar este tipo de reacción, no obstante, se ha descrito en respuesta a muchos medicamentos como corticoides, antihistamínicos, antibióticos, anti-inflamatorios no esteroideos e incluso frente a algunos excipientes de formulaciones farmacéuticas como el propilenglicol[65].

### **1.1.4.3. Dermatitis de contacto irritativa**

La dermatitis de contacto irritativa es una reacción no inmunológica de localización cutánea inespecífica cuya causa puede ser de varios tipos: mecánica, física o química. Es la causa más común de dermatitis de contacto y representa aproximadamente el 80% de los casos de dermatitis de contacto ocupacional.

Varios mecanismos están implicados en el desarrollo de la dermatitis de contacto irritativa. El primer paso es la disfunción de la barrera epidérmica por los compuestos irritantes. Esto conlleva un aumento de la permeabilidad de la piel y una pérdida de agua transepidérmica. Estos cambios en la piel inducen la liberación de citoquinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF- $\alpha$ ) por los queratinocitos. Estas citoquinas actúan como señal para el aumento de quimiocinas pro-inflamatorias que reclutan células mono- y polimorfonucleares en el sitio de lesión. Varios factores se han asociado al desarrollo

de esta reacción, como la edad (la reactividad disminuye con la edad), el sexo (más frecuente en mujeres que en hombres), el lugar del cuerpo expuesto (más común en el dorso de las manos y los dedos), los individuos con dermatitis atópica son más propensos a ser afectados por compuestos irritantes. También existen factores ambientales que favorecen el desarrollo de la reacción como la baja humedad, o las temperaturas bajas. No obstante, un exceso de humedad también puede potenciar la respuesta inflamatoria frente a compuestos irritantes[66].

### **1.2. Relación estructura química – hipersensibilidad**

Históricamente los modelos animales han sido los más utilizados para medir el potencial sensibilizante de compuestos químicos. Entre ellos, los más utilizados han sido el “guinea pig test” y LLNA. En los últimos años, debido al endurecimiento legislativo en cuanto a la experimentación animal ha sido necesario desarrollar otros métodos que nos permitan evaluar y/o predecir el potencial sensibilizante de un determinado compuesto o grupo de compuestos. En este sentido se han desarrollado modelos computacionales basados en la relación entre la estructura química y/o propiedades fisicoquímicas y el potencial toxicológico de los compuestos químicos, llegando a alcanzar hasta el 90% eficacia predictiva[67].

#### **1.2.1. Dominios estructurales y sensibilización cutánea. Análisis SAR**

La actividad biológica de un compuesto es el resultado de múltiples factores que influyen en la interacción con el organismo en el cual ejercen sus efectos fármaco/toxicológicos. Los estudios de relación estructura-actividad química se basan en el efecto de las distintas estructuras químicas de una molécula para ejercer el efecto biológico. De este concepto surge el concepto de farmacóforo y toxicóforo, que se definen como la estructura química responsable de la actividad biológica de un determinado fármaco o tóxico respectivamente. Por lo tanto, el objetivo de los

estudios SAR es encontrar estructuras químicas que se relacionen con un efecto biológico. Para la realización de estos estudios es necesario analizar gran cantidad de compuestos y observar la presencia de un determinado efecto biológico, como, por ejemplo, el desarrollo de dermatitis de contacto, para poder relacionar la presencia de grupos químicos con la aparición de dicho efecto. Esto permite la generación de bases de datos que relacionan grupos químicos con una determinada reacción y nos puede servir para predecir si una molécula tiene potencial para desarrollar dicho efecto[68].

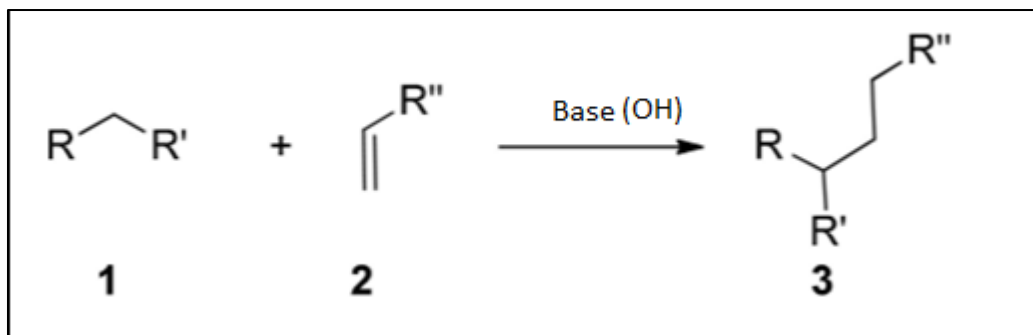
Se han descrito 7 mecanismos que permiten clasificar los compuestos sensibilizantes según sus características químicas[69]:

- 1) Aceptores de Micheal
- 2) Electrófilos Sn<sub>2</sub>
- 3) Electrófilos Sn-Ar
- 4) Formadores de base de Schiff
- 5) Agentes acilantes
- 6) Agentes no reactivos
- 7) Casos especiales

### **1.2.1.1. Aceptores de Michael**

El mecanismo que siguen estos compuestos es la adición de Michael que consiste en la adición nucleofílica de un carbanión u otro nucleófilo a un compuesto  $\alpha,\beta$ -insaturado (aceptor de Michael) en medio básico (Fig8).





*Figura 8. Reacción típica de adición de Michael. Modificado de Fotouhi LI*

Los radicales R y R' del nucleófilo (1) deben ser grupos aceptores de electrones que consigan polarizar la carga del grupo metileno de manera que se consiga aumentar la acidez de este y en presencia de una base se forme un carbanión. El radical R'' del aceptor de Michael (2) frecuentemente es una cetona, de manera que, el aceptor de Michael típico es una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Esto genera un carbono con densidad de carga positiva (electrófilo) susceptible de reaccionar con un compuesto nucleofílico en las condiciones adecuadas. Cuando se produce la reacción se genera un enolato intermedio que en presencia de una base adecuada genera el producto final de la reacción [70]

A veces el compuesto no es un aceptor de Michael pero puede convertirse en uno mediante una reacción simple que puede producirse in vivo. A este tipo de compuestos los agrupamos dentro del mismo grupo por su mecanismo de acción y los podemos clasificar como pre-aceptores de Michael. En la figura 9 (Fig9) se muestran tres ejemplos de pre-aceptores de Michael que mediante una reacción de oxidación generan un carbono electrófilo susceptible de ser atacado por un donador de Michael y generar la reacción (Fig10)[71].

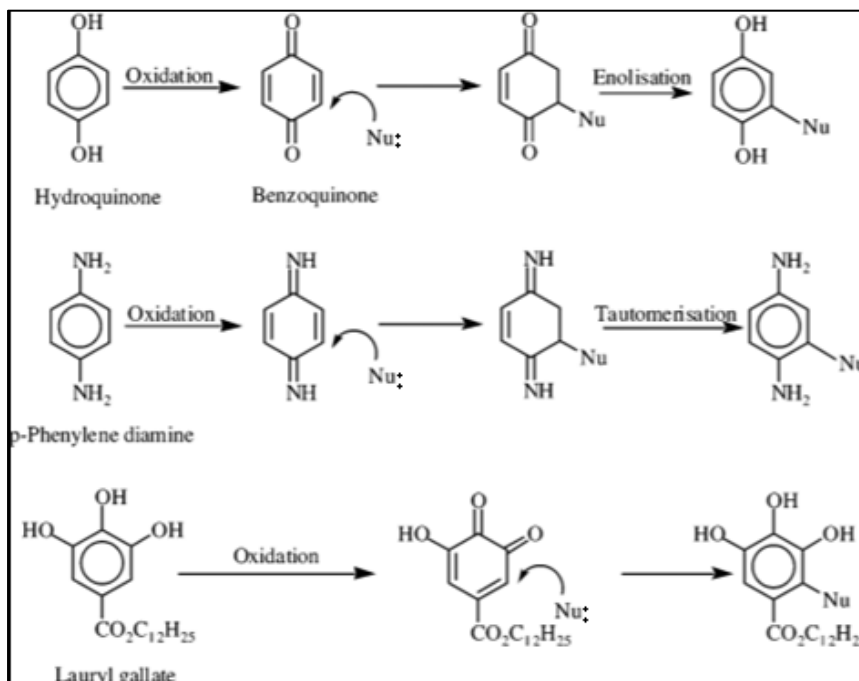


Figura 9. Pre-aceptores de Michel que se activan mediante oxidación, modificado de Aptula AO.

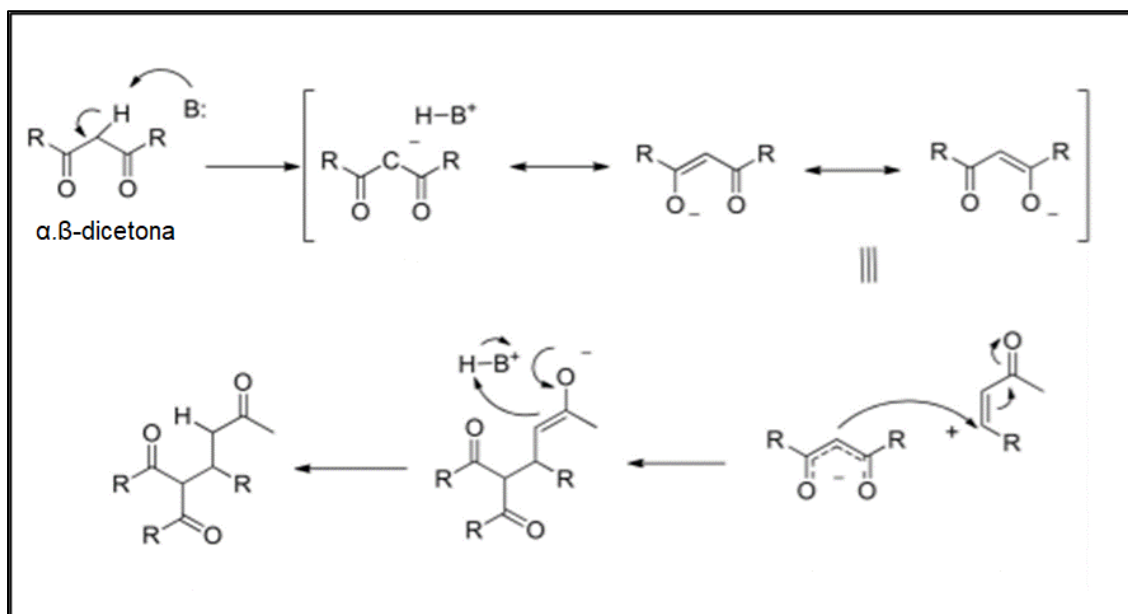


Figura 10. Mecanismo de reacción tipo aceptor de Michel de una  $\alpha,\beta$ -dicetona en medio básico.

Existen compuestos que se pueden clasificar en este grupo, aunque no se pueden descartar otros mecanismos posibles. Un subgrupo de estos compuestos son los compuestos aromáticos con grupos hidroxilo o amino en meta (*m*). Para este tipo de compuestos se pueden deducir dos mecanismos: La reacción con O<sub>2</sub> generando un grupo hidroxilo en orto (*o*) o para (*p*) respecto a los grupos hidroxilo o amino originales y, por otro lado, la reacción directa con las proteínas mediante el ataque de un radical. En el primer mecanismo propuesto el producto de la oxidación sería un pre-aceptor de Michael análogo a la hidroquinona. Para medir la potencia sensibilizante de este tipo de estructuras químicas se utilizan compuestos químicos que las contengan y se testan en el ensayo del LLNA, permitiendo establecer relaciones estructurales en función de la potencia de sensibilización medida como EC3, que representa la concentración efectiva de la sustancia problema necesaria para producir un aumento de tres veces en el índice de estimulación en comparación con los controles tratados con vehículo. En la tabla 5 se recogen compuestos pertenecientes a esta categoría (aceptores y pro-aceptores de Michael y mecanismo mixto) y se relacionan con la potencia sensibilizante[69]

Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante	Tipo de agrupación	Dominio tipo aceptor de Michael
p-benzoquinona	106-51-4	0.0099	Extremo	1	I
Hidroquinona	123-31-9	0.11	Fuerte	3	IX
1,4-fenilendiamina	106-50-3	0.16	Fuerte	4	IX
2,5-diamino-tolueno	95-70-5	0.2	Fuerte	4	IX
Lauril galato	1166-52-5	0.3	Fuerte	3	IX
2-aminofenol	95-55-6	0.4	Fuerte	4	IX
2-nitro-p-fenilendiamina	5307-14-2	0.4	Fuerte	4	IX

## INTRODUCCIÓN

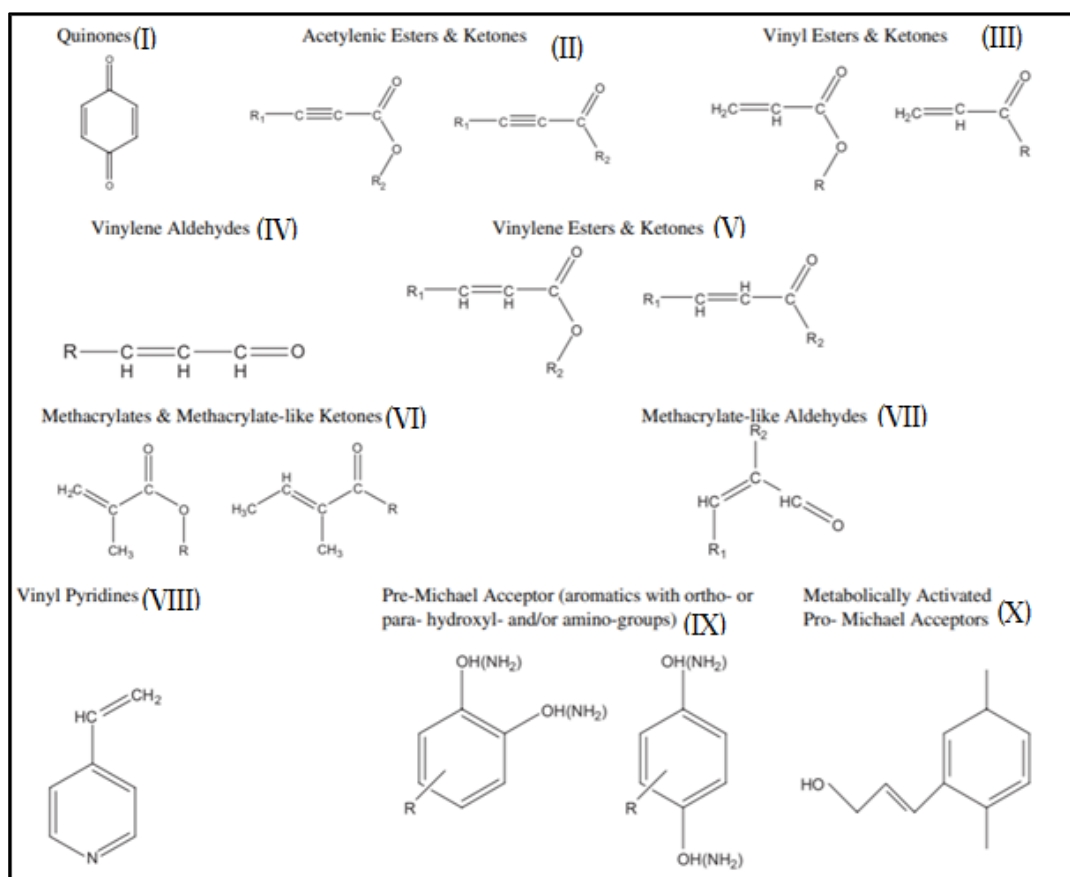
2-metil-5-hidroxi-etilaminofenol	55302-96-0	0.4	Fuerte	4	X
3-fenilendiamina	108-45-2	0.49	Fuerte	4	X
4-(N-Etil-N-2-metan-sulfonamida-etil)-2-metil-1,4-fenilendiamina (CD3)	25646-71-3	0.6	Fuerte	4	IX
Isopropil isougenol		0.6	Fuerte	4	X
Metol	55-55-0	0.8	Fuerte	4	IX
1,2-dibromo-2,4-dicianobutano	35681-65-7	0.9	Fuerte	3	-
3-metil-4-fenil-1,2,5-tiadiazol-1,1-dioxido (MPT)	3775-21-1	1.4	Moderado	1	-
2-hidroxi-etil acrilato	818-61-1	1.4	Moderado	1	III
6-metilisougenol	13041-12-8	1.6	Moderado	4	X
Vinyl piridina	1337-81-1	1.6	Moderado	1	VIII
Isoeugenol	97-54-1	1.7	Moderado	4	X
5,5-dimetil-3-metilendihidro-2(3H)-furanona	29043-97-8	1.8	Moderado	1	-
2-amino-6-cloro-4-nitrofenol	6358-09-4	2.2	Moderado	4	IX
HC Red no3	2871-01-4	2.2	Moderado	4	IX
Trans-anetol	104-46-1	2.3	Moderado	4	X
Trans-2-decenal	3913-71-1	2.5	Moderado	1	IV
Metil-2-noninoato	111-80-8	2.5	Moderado	1	II
Aldehído cinámico	104-55-2	3.0	Moderado	1	IV
3-aminofenol	591-27-5	3.2	Moderado	4	X
3-bromometil-5,5-dimetil-dihidro-2(3H)-furanona	154750-20-6	3.6	Moderado	4	-
3-metilisougenol	186743-29-3	3.6	Moderado	4	X
4-fenil-3-buten-2-ona	122-57-6	3.7	Moderado	1	V

2,4-heptdienal	5910-85-0	4.0	Moderado	1	IV
$\alpha$ -metil cinamaldehido	101-39-3	4.5	Moderado	1	VII
Trans-2-hexenal	6728-26-3	5.5	Moderado	1	IV
2-metoxi-4-metil-fenol	93-51-6	5.8	Moderado	3	X
Dietil maleato	141-05-9	5.8	Moderado	1	V
Dihidroeugenol	2785-87-7	6.8	Moderado	4	X
Safranal	116-26-7	7.5	Moderado	1	VII
Perilaldehido	211-75-3	8.1	Moderado	1	VII
1-(p-metoxifenil)-1-penten-3-ona	104-27-8	9.3	Moderado	1	V
Hexil cinamaldehido	101-86-0	11	Débil	2	VII
Amil cinamaldehido	122-40-7	11	Débil	2	VII
$\alpha$ -butil cinamaldehido	7492-44-6	11	Débil	2	VII
Eugenol	97-53-0	13	Débil	4	X
5-megileugenol	186743-25-9	13	Débil	4	X
6-metileugenol	186743-24-8	17	Débil	4	X
4-alilanol	140-67-0	18	Débil	4	X
Alcohol cinámico	104-54-1	21	Débil	2	X
Etil acrilato	140-88-5	28	Débil	1	III
Etilen glicol dimetacrilato	97-90-5	28	Débil	1	VI
3-metileugenol	186743-26-0	32	Débil	4	X
Isopropil eugenol		NC	NS	4	X
Cumarina	91-64-5	NC	NS	1	V
2-hidroxipropil metacrilato	923-26-2	NC	NS	1	VI
6-metilcumarina	92-48-8	NC	NS	1	V
Cloruro de vinilideno	75-35-4	NC	NS	1	-
Resorcinol	108-46-3	NC	NS	4,5	X

**Tabla 5.** Compuestos con dominio tipo aceptor de Michael. (1) Agrupación como aceptor de Michael definitiva. (2) Probable aceptor de Michael, sin descartar otros posibles mecanismos. (3) Asignación como pre-aceptor de Michael definitiva. (4) Probable pre-aceptor de Michael, sin descartar otros posibles mecanismos. NC: No calculable. NS: No sensibilizante. Los dominios estructurales se subclasifican en (I) quinonas; (II) ésteres acetilénicos y cetonas; (III) Ésteres vinílicos y cetonas (IV)

*Vinilen aldeídos; (V) Vinilen ésteres y cetonas. (VI) Metacrilatos y metacrilatos tipo cetona; (VII) Metacrilatos tipo aldehído; (VIII) Vinil Piridinas; (IX) Pre-aceptores de Michael aromáticos; (X) Pre-aceptores de Michael activados metabólicamente.*

Profundizando en el análisis de estos compuestos pueden extraerse diferentes subcategorías y crear una clasificación de subgrupos en función de los dominios específicos que aportan las cualidades a un acepto/pro-aceptor de Michael. En este sentido se han creado 9 subcategorías caracterizadas por la presencia de un enlace  $\alpha,\beta$ -insaturado polarizado (Fig11)[72]



**Figura 11.** Dominios estructurales tipo acepto de Michael. Modificado de Schultz TW

Para evaluar el carácter electrófilo de estos dominios Schultz et al [72] testaron estos compuestos en el ensayo in chemico de GSH, en el cual se utiliza el carácter nucleófilo del glutatión para medir la reactividad de los compuestos electrófilos. De estos experimentos se obtienen las siguientes conclusiones:

- a. De la categoría I (quinonas) sólo la p-benzoquinona ha sido testada en LLNA. Del resto de quinonas testadas in chemico GSH se deduce que las que tienen al menos un hidrogeno sustituido en el carbono alfa serán potenciales sensibilizantes fuertes.
- b. Las categorías II, III y IV se engloban como estructuras con potencial sensibilizante moderado.
- c. La categoría V (Esteres y cetonas vinilénicas) pueden categorizarse como sensibilizantes moderados. Aunque algunas estructuras como anillos aromáticos pueden disminuir su reactividad química.
- d. Las categorías VI y VII se caracterizan por poseer un dominio estructural que tendrá potencial sensibilizante moderado/débil. La presencia de un grupo alquil en el carbono  $\alpha$  disminuye la polarización y la reactividad química
- e. La categoría VIII (vinil piridinas) se comportan como sensibilizantes moderados. En concreto las vinil piridinas en posiciones orto- y para-
- f. La categoría IX contiene compuestos con un fuerte potencial sensibilizante en LLNA. No obstante, los compuestos dihidroxilo derivados son más reactivos que los amino derivados.
- g. Los compuestos de la categoría X muestran un potencial fuerte/moderado en LLNA, mientras que la reactividad en el ensayo GSH no son reactivos, lo cual concuerda con su mecanismo de acción que requiere de la activación metabólica in vivo para desarrollar su potencial sensibilizante.

### 1.2.1.2. Electrófilos Sn2

La reacción de sustitución por Sn2 se caracteriza por la presencia de grupos salientes. Estos grupos salientes deben tener ciertas características como; elevada electronegatividad, basicidad moderada, tamaño adecuado o estabilización del ion por resonancia. Un grupo de átomos con buenas propiedades como grupo saliente son los halógenos. En este tipo de reacción se produce el ataque nucleofílico en una sola etapa, de manera que se produce al mismo tiempo el ataque nucleofílico y la salida del grupo saliente. Se trata de una reacción estereoespecífica y con inversión de la configuración en la mayoría de los casos.

Estos compuestos pueden subclasificarse en no polares y polares-H (Tabla6)[69,73]. Los electrófilos Sn2 no polares son en su mayoría haloalcanos y dada su elevada reactividad son potentes sensibilizantes. Los electrófilos polares-H se caracterizan por tener un grupo capaz de actuar como aceptor o dador de hidrógeno, siendo capaces por tanto de generar enlaces intermoleculares de hidrógeno.

Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante
1-clorometilpireno	1086-00-6	0.005	Extremo
4-nitrobenzil bromuro*	100-11-8	0.05	Extremo
Propiolactona*	57-57-8	0.15	Fuerte
Dimetil sulfato*	77-70-1	0.19	Fuerte
Benzil bromuro	100-30-0	0.2	Fuerte
Metil dodecano sulfonato*	2374-65-4	0.39	Fuerte
Metil hexadecano sulfonato*	26452-48-2	0.8	Fuerte
Bisfenol A-diglicidil éter*	1675-54-3	1.5	Moderado
1-bromohexadecano*	112-82-3	2.3	Moderado
Dietilsulfato*	64-67-5	3.3	Moderado
Ácido 2-bromotetradecanoico*	10520-81-7	3.4	Moderado
1-bromoheptadecano	3508-00-7	4.8	Moderado
1-bromopentadecano	629-72-1	5.1	Moderado



1-bromoeicosano	4276-49-7	6.1	Moderado
12-bromo 1-dodeanol*	3344-77-2	6.9	Moderado
Metil metanosulfonato*	66-27-3	8.1	Moderado
1-bromodocosano	6938-66-5	8.3	Moderado
Dodecil metano sulfonato*	51323-71-8	8.8	Moderado
1-clorohexadecano	4860-03-1	9.1	Moderado
1-bromotetradecano	112-71-0	9.2	Moderado
1-bromohexano	111-25-1	10	Débil
1-bromotridecano	765-09-3	10	Débil
1-yodododecano	4292-19-7	13	Débil
1-yodotetradecano	19218-94-1	14	Débil
1-bromooctadecano	112-89-0	15	Débil
1-clorooctadecano	3386-33-2	16	Débil
Benzil benzoato*	120-51-4	17	Débil
1-bromododecano	143-15-17	18	Débil
Ácido 12-bromododecanoico	73367-80-3	18	Débil
1-yodoheptadecano	544-77-4	19	Débil
1-bromoundecano	693-67-4	20	Débil
1-clorotetradecano	2425-54-99	20	Débil
7-bromotetradecano	74036-97-8	21	Débil
1-yodononano	4282-42-2	24	Débil
Oleil metano sulfonato*	35709-09-2	25	Débil
Butil glicidil etere*	2426-08-6	31	Débil
1-bromobutano	109-65-9	NC	NS
1-bromononano	693-58-3	NC	NS
1-clorononano	2473-01-0	NC	NS
1-yodohexano	638-45-9	NC	NS
1-yodoctadecano	629-93-6	NC	NS
Metil hexadecano sulfonato*	4230-15-3	NC	NS

**Tabla 6.** Dominios Sn2. \*polar-H

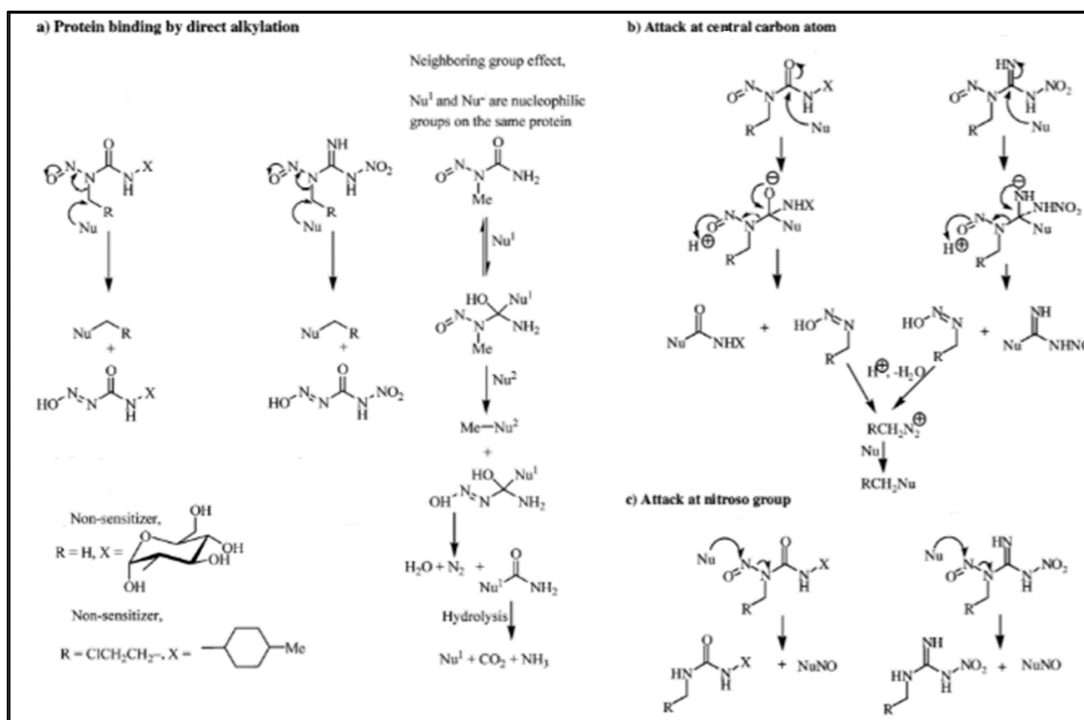
La necesidad de diferenciar entre electrófilos Sn2 polares y no polares radica en la influencia del coeficiente de reparto (logP) en el potencial sensibilizante in vivo, ya que el mecanismo químico en ambos tipos de compuestos es similar[73].

Dentro del mecanismo Sn2 podemos encontrar un tercer grupo de compuestos; los compuestos electrófilos Sn2 oxofílicos (Tabla7). Este tipo de compuestos tienen potencial genotóxico, carcinogénico y mutagénico conocido ya que son capaces de alquilar el ADN. Estos compuestos forman un carbocatión intermediario altamente inestable. No obstante, en la reacción con proteínas nucleófilas existen varios mecanismos posibles (Fig12).

Compuesto	LLNA (concentración y respuestas)		
<b>1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (68)</b>			
Conc test (%)	0.05	0.1	0.25
IS	27.5	60.4	78.3
<b>1-etil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (67)</b>			
Conc test (%)	0.05	0.1	0.25
IS	5.7	9.6	8.4
<b>N-metil-N-nitrosourea (70)</b>			
Conc test (%)	0.05	0.1	0.25
IS	2.7	7.1	15.4
<b>1-propil-3nitro-1-nitrosoguanidina (60)</b>			
Conc test (%)	0.1	0.25	1
IS	3	9.8	8.5
<b>N-etil-N-nitrosourea (69)</b>			
Conc test (%)	0.25	1	10
IS	1	2.7	22.3
<b>N-(4-metilciclohexil)-N-(2-cloroetil)-N-nitrosourea (103)</b>			
Conc test (%)	0.5	1	2.5
IS	0.9	1.5	0.5
<b>Estreptozocina (102)</b>			
Conc test (%)	0.5	1	2.5
IS	0.5	0.6	0.6

**Tabla 7.** Electr6filos Sn2 oxof6licos. IS: 6ndice de estimulaci6n

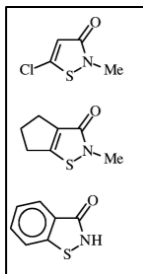
El primero de estos mecanismos es el ataque nucleofílico de la proteína al grupo N-alkilo. En el caso de la N-metil-nitrosourea se da un efecto de grupo vecino, en el



**Figura 12.** Mecanismos de interacción de proteínas nucleófilas con electrófilos Sn<sub>2</sub> oxofílicos. Modificado de Landsteiner K

cual se producen dos ataques nucleofílicos de dos centros nucleofilos diferentes de la misma proteína, uno sobre el carbono central de la urea y después se produce la alquilación del segundo nucleófilo (Fig12a). El segundo mecanismo es el ataque nucleófilo de la proteína al carbono central del dominio urea o guanidina, lo cual genera un catión diazoalquilo que provoca la alquilación de la proteína (Fig12b). El tercer mecanismo consiste un ataque nucleofilo en el grupo nitro (Fig12c)[73].

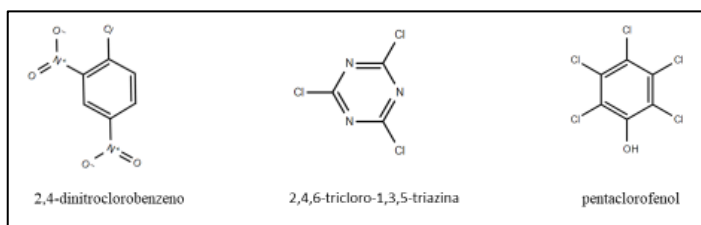
Un último grupo de electrófilos Sn<sub>2</sub> son los compuestos sulfurados, donde encontramos 3 compuestos; 5-cloro-2-metil-4-ixotiazolin-3-ona, 2-metil-4,5-trimetilen-4-isotiazolin-3-ona y 1,2-benzisotiazolin-3-ona (Fig13).



**Figura 13.** Electr6filos Sn2 sulfurados

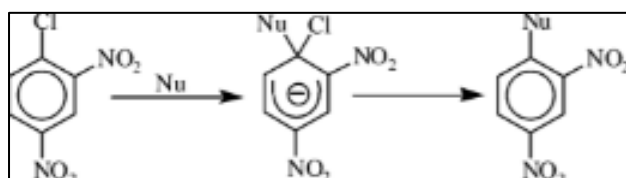
### 1.2.1.3. Electr6filos SnAr

Estos compuestos se caracterizan por tener un grupo arom6tico sustituido con un buen grupo saliente y radicales que favorecen la SnAr. En este grupo encontramos 3 compuestos (Fig14).



**Figura 14.** Electr6filos SnAr

El DNCB es conocido como un sensibilizante extremo en el LLNA (EC3 = 0.04%). El ataque del nucle6filo se produce mediante la generaci6n de un an6n intermedio que es estabilizado por los dos grupos nitro de la mol6cula, que son mucho m6s electronegativos que el grupo carbonilo (Fig15). La estabilizaci6n de este intermedio



**Figura 15.** Mecanismo de reacci6n SnAr del DNCB con nucle6filos

de reacción podría explicar la mayor reactividad y poder sensibilizante que los aceptores/pro-aceptores de Michael[71]

La sustitución aromática, y en concreto el DNCB, fue uno de los primeros mecanismos en relacionarse con el potencial sensibilizante. Ya en 1936, Landsteiner, K., y Jacobs, J. L.[74], describieron la relación entre el potencial sensibilizante y electrófilo de algunos compuestos aromáticos halogenados (Fig16). Estos resultados sugieren que la sustitución en orto- y para- con grupos eletroatrayentes aumenta el potencial sensibilizante de los compuestos aromáticos halogenados. Este efecto electrónico se puede medir mediante la constante de Hammett ( $\sigma$ ) y permite establecer modelos QSAR[75].

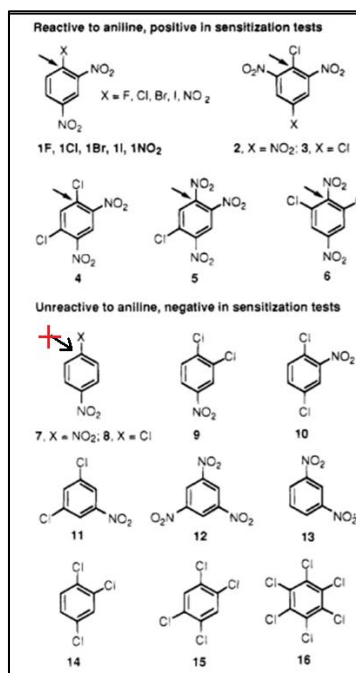


Figura 16. Relación sensibilización/electrofilia de compuestos aromáticos halogenados. Modificado de Hussain Z

#### 1.2.1.4. Formadores de base de Schiff

Las bases de Schiff son análogos de aldehídos o cetonas en los que el grupo carbonilo es sustituido por un grupo imino o azometino[76]. Por lo tanto, este grupo de

compuestos se van a caracterizar por la presencia de grupos carbonilo capaces de formar bases de Schiff mediante la reacción con un grupo amino. También pueden considerarse como pre-formadores de base Schiff compuestos con grupos amino capaces de formar carbonilos mediante desaminación oxidativa y también grupos OH por vía oxidativa[69]. Los principales compuestos de este grupo van a ser aldehídos y cetonas alifáticas (Tabla8), cuyo mecanismo potencial sensibilizante se atribuye a la deficiencia electrónica del carbono carbonílico [71].

Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante
Glutaraldehido	111-30-8	0.1	Fuerte
Formaldehido	50-00-0	0.7	Fuerte
Fenilacetaldhido	122-78-1	3.0	Moderado
Lilial	80-54-6	18.7	Débil
Ciclamen aldehído	103-95-7	22.3	Débil
Hidroxicitronelal	107-75-5	23.0	Débil
5-metil-2,3-hexandiona	13706-86-0	25.8	Débil

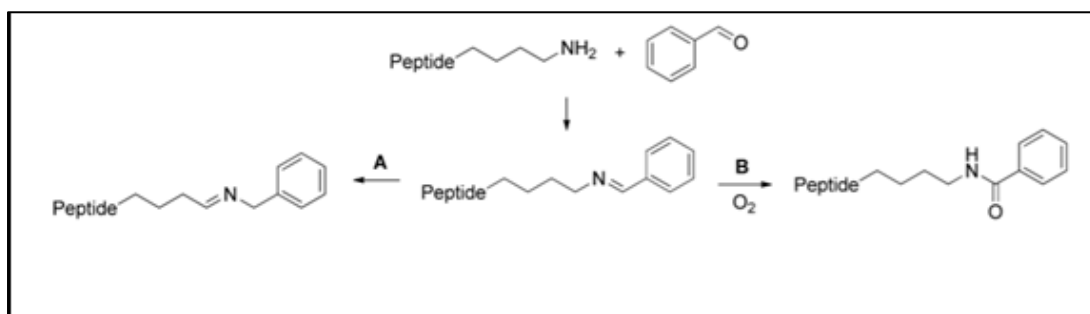
**Tabla 8.** *Compuestos formadores de base de Schiff*

Existen factores electrónicos y estéricos que pueden modificar el potencial sensibilizante de este tipo de compuestos:

- Las cadenas alquilo ramificadas cerca de los grupos carbonilo aumentan su densidad electrónica y por tanto disminuyen la reactividad del carbono del grupo carbonilo
- El efecto estérico de ciertos radicales puede disminuir la reactividad con los grupos nucleófilos de las proteínas y por tanto disminuir su potencial sensibilizante in vivo.

Los aldehídos aromáticos son un grupo principal en este tipo de reacciones, no obstante, la capacidad de formar bases de Schiff depende de varios factores; (i) la

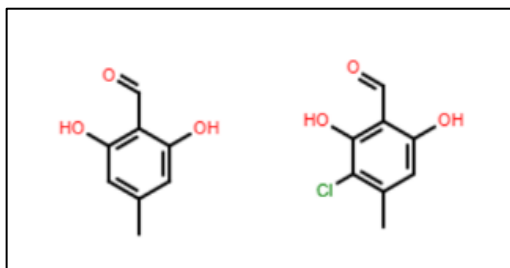
concentración de agua en el medio, (ii) la cantidad de aldehído libre y (iii) el pH del medio que influirá en la protonación del grupo amino y por tanto va a afectar al carácter nucleófilo. Además, es importante tener en cuenta el carácter reversible de la formación de bases de Schiff en medio acuoso. Estas características son importantes para explicar por qué algunos compuestos sensibilizantes in vivo apenas son reactivos en el ensayo de depleción peptídica DPRA, a menos que se añada un agente reductor como el cianoborohidruro sódico. Estos resultados hacen indicar que la formación de una base de Schiff es el primer paso que se produce in vivo en el proceso de sensibilización, seguido de una reacción oxidación generando una amida más estable (Fig17) que dará lugar a la generación de neoantígenos y el posterior procesamiento para desencadenar la reacción sensibilizante[77].



**Figura 17. Posibles mecanismos de descomposición de la base de Schiff del benzaldehído.** (A) por desaminación oxidativa y (B) por oxidación formando una amida. Modificado de Roberts DW

La comparación entre diferentes aldehídos aromáticos o benzaldehídos (BAs) establece un orden de reactividad en función de los radicales y su posición, de la siguiente manera: *o*-hidroxi Bas > BAs no sustituidos > *p*-alquil BAs > *p*-metoxi BAs > *p*-hidroxi BAs. Dos ejemplos de los compuestos más sensibilizantes y reactivos en presencia de aminas son el atranol y cloroatranol (Fig18) que son compuestos utilizados para la elaboración de fragancias. Esta elevada reactividad podría explicarse por la formación de un tautómero enaminona/imina. Además de la

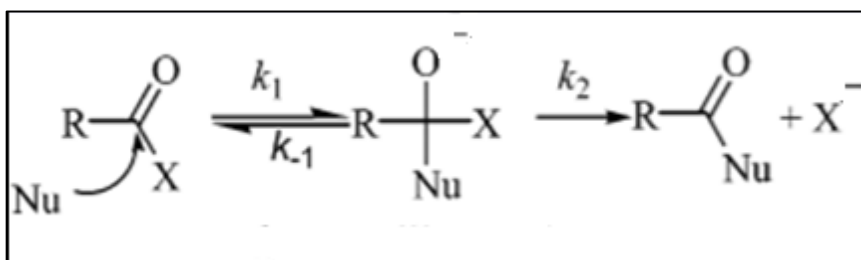
formación de enlaces de hidrógeno entre el nitrógeno y el grupo carbonilo del tautómero enaminona[77].



**Figura 18.** Atranol (izq) y cloroatranol (dcha)

### 1.2.1.5. Agentes acilantes

Los agentes acilantes tienen la estructura general RCOX y la reacción con los nucleófilos suceden a través de un intermediario tetraédrico (Fig19). La capacidad de actuar como agente acilante depende en gran medida de la capacidad del grupo X de actuar como buen grupo saliente. Este aspecto depende a su vez de la acidez del ácido



**Figura 19.** Mecanismo de reacción de los agentes acilantes mediante un intermediario tetraédrico. Modificado de Roberts DW.

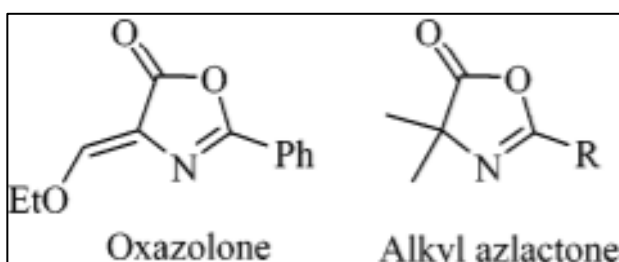
conjugado XH, de manera que a mayor acidez mayor reactividad del grupo RCOX. Por este motivo, los haluros acilo (X = halógeno) y los anhídridos (X = OCOR) serán más reactivos que los ésteres de arilo (XH es un fenol), aunque estos últimos a menudo son suficientemente reactivos para tener poder sensibilizante. Los ésteres de alquilo (X = alquilo) generalmente no son suficiente reactivos para actuar como sensibilizantes.



Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante
Oxazolona	15646-46-5	0.003	Extremo
Tetraclorosalicilanilida	1154-59-2	0.04	Extremo
Fluorescein-5-isotiocianato	3326-32-7	0.14	Fuerte
2-metil-4H,3,1-benzoxazin-4-ona	525-76-8	0.7	Fuerte
C6-azlactona	176665-02-4	1.3	Moderado
2-mercaptobenotiazol	149-30-4	1.7	Moderado
Cloruro de nonanoilo	764-85-2	1.8	Moderado
C4-azlactona	176664-99-6	1.8	Moderado
Metil 2-sulfofenil octadecanoato		2	Moderado
Cloruro de isononanoilo	57077-36-8	2.7	Moderado
Cloruro de 3,5,5-trimetilhexanoilo	36727-29-4	2.7	Moderado
C9-azlactona	176665-04-6	2.8	Moderado
3-propilidenftalida	17369-59-4	3.7	Moderado
3,4-dihidrocumarina	119-84-6	5.6	Moderado
3,5,5-trimetilhexanoiloxi bencenosulfonato sódico	94612-91-6	6.4	Moderado
Cloruro de palmitoilo	112-67-4	8.8	Moderado
Anhídrido bencenotricarboxílico	1,2,4- 552-30-7	9.2	Moderado
Lauroil lactilato sódico	13557-75-0	15	Débil
C11-azlactona	176665-06-8	16	Débil
C15-azlactona	176665-09-1	18	Débil
C17-azlactona	176665-11-5	19	Débil
Fenil benzoato	93-99-2	20	Débil
Imidazolidinil urea	39236-46-9	24	Débil
C19-azlactona		26	Débil
Penicilina G	61-33-6	30	Débil
Sacarina	81-07-2	NC	No sensibilizante

**Tabla 9.** Agentes acilantes

La oxazolona se caracteriza por tener un doble enlace exocíclico (Fig20) y se clasifica como un sensibilizante extremo que probablemente actúe por un mecanismo más complejo que el resto de complejos. El resto de azlactonas son series homologas en las cuales su potencial de sensibilización aumenta con el logP entre los homologos C4 y C6. Esto es indicativo de la mayor penetración en el estrato córneo[69].



**Figura 20.** Estructura química de la oxazolona y el resto de alquil azlactonas

### 1.2.1.6. Compuestos no reactivos

En este grupo se engloban varios compuestos que estimulan cierta respuesta en LLNA y se clasifican como sensibilizantes débiles. No obstante, muchos de ellos se consideran falsos positivos, ya que se consideran compuestos irritantes. Y otros a pesar de ser positivos se considera que el motivo de su positividad es mediante la generación de productos secundarios a partir de su degradación, ya que cuando se testea el compuesto puro no genera respuesta en el ensayo LLNA (Tabla10)

Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante
Lauril sulfato sódico	151-21-3	1.3	Moderado <sup>a</sup>
Ácido abietico	514-10-3	15	Débil <sup>b</sup>
Ácido oxálico	144-62-7	15	Débil <sup>a</sup>
Linalool	78-70-6	30	Débil <sup>b</sup>
Miristato de isopropilo	110-27-0	44	Débil <sup>a</sup>
R(+)-limoneno	5989-27-5	69	Débil <sup>b</sup>

Dimetilsulfóxido	67-68-5	72	Débil <sup>a</sup>
Piridina	110-86-1	72	Débil <sup>a</sup>
Anilina	62-53-3	89	Débil <sup>a</sup>

**Tabla 10. Agentes no reactivos testados como positivos en LLNA.** <sup>a</sup> Compuestos considerados falsos positivos, son irritantes a las concentraciones testadas. <sup>b</sup> Compuestos que cuando son testados puros no son sensibilizantes y en función de las condiciones de almacenamiento producen un test positivo LLNA

### 1.2.1.7. Casos especiales

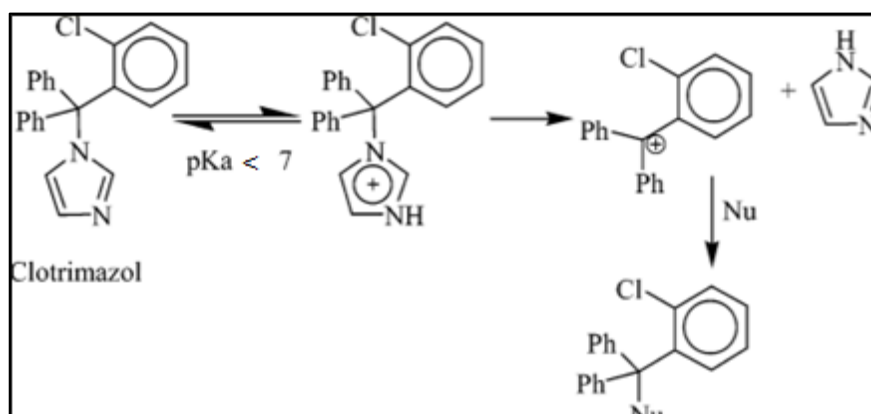
En este apartado especial se incluyen según Roberts DW, et al. [69] dos subgrupos: (a) Por una parte se engloban los compuestos que pueden ser incluidos en uno de los grupos descritos anteriormente, pero requieren confirmación. (b) Compuestos que no se pueden incluir en los grupos anteriores (Tabla 11)

Nombre químico	CAS #	LLNA EC3%	Potencia sensibilizante	Grupo
Clotrimazol	23593-75-1	4.8	Moderado	
Dicromato potásico	7778-50-9	0.08	Extremo	
Benzo[ <i>a</i> ]pireno	50-32-8	0.0009	Extremo	Pre-Sn2, vía oxidación
7,12,dimetilbenz[ <i>a</i> ]antraceno	57-97-6	0.006	Extremo	Pre-Sn2, vía oxidación
5-cloro-2metil-4-isotiazolin-3-ona	26172-55-4	0.009	Extremo	Probable reacción Sn2 en el átomo S
1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina	70-25-7	0.003	Extremo	Derivado N-nitroso con mecanismo probable Sn2 o pre-Sn2
N-metil-N-nitrosourea	684-93-5	0.05	Extremo	Derivado N-nitroso con mecanismo probable Sn2 o pre-Sn2
N-etil-N-nitrosourea	759-73-9	1.1	Moderado	Derivado N-nitroso con mecanismo probable Sn2 o pre-Sn2

2-metil-2H-isotiazol-3-ona	2692-20-4	1.9	Moderado	Probable reacción Sn2 en el átomo S
1,2-benzoisotiazolin-3-ona	2634-33-5	2.3	Moderado	Probable reacción Sn2 en el átomo S
Tetrametiltiuram disulfuro	137-26-8	5.2	Moderado	Probable reacción Sn2 en el átomo S
1-naftol	90-15-3	1.3	Moderado	Probable aceptor de Michel vía tautómero ceto

**Tabla 11.** Compuestos incluidos en el apartado casos especiales y su posible mecanismo de acción

El cotrimazol se descompone por hidrólisis en medios ácidos acuosos con la aplicación de calor. Esto podría indicar que el mecanismo por el que se produce la reacción con nucleófilos podría ser una sustitución Sn1 (Fig21). El dicromato de potasio es un compuesto oxidante y una fuente de iones de cromo trivalentes. Los iones metálicos del estado de transición pueden actuar como iones carbonio ( $C^+$ ) capaces de unirse covalentemente a las proteínas formando complejos de coordinación.



**Figura 21.** Mecanismo de reacción con nucleófilos del clotrimazol mediante sustitución nucleofílica Sn1

### 1.2.2. Análisis Relación Estructura-Actividad Cuantitativo (QSAR)

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso complejo que puede basarse en distintas estrategias para encontrar moléculas con actividad biológica. Las herramientas bioinformáticas han obtenido un rol importante en este sentido ya que

permiten obtener información a partir de grandes bases de datos. Una de estas herramientas es el análisis cuantitativo Estructura-Actividad (QSAR) que consiste en buscar descriptores que permitan asociarse a una determinada actividad biológica. Esto permite predecir la actividad biológica de una determinada modificación química y realizar una síntesis de fármacos dirigida y racional. Podemos diferenciar los análisis QSAR en 3 grupos[78]:

- Análisis QSAR basado en propiedades físico-químicas como coeficiente hidrofiliia/hidrofobia ( $\log P$ ), efectos estéricos, electrostáticos, tensión superficial, etc.
- Análisis QSAR basado en la conectividad molecular mediante el análisis en 2 dimensiones.
- Análisis QSAR en 3 dimensiones que tienen en cuenta la estructura tridimensional de la molécula

Además, los estudios QSAR pueden clasificarse en función del tipo de correlación que utilizan. Diferenciando modelos lineales con regresión lineal simple o múltiple o modelos de regresión no lineal.

La creación de un modelo de predicción QSAR debe estar correctamente validada para asegurar una correcta exactitud predictiva. Para ello la OCDE ha definido 5 principios de validación que debe cumplir un modelo QSAR[79]:

1. Endpoint definido: Entendiendo endpoint como cualquier efecto fisicoquímico, biológico o medioambiental que puede ser medido y modelado. Esto es importante teniendo cuenta que los modelos QSAR a menudo se desarrollan a partir de estudios y bases de datos diversas que no son uniformes en sus protocolos y condiciones.
2. Protocolo inequívoco: El objeto final (endpoint) o propiedad a predecir por el modelo debe estar específicamente relacionada con la estructura química. Esto

implica que los valores de los descriptores y la ecuación para el modelo QSAR deben estar identificados, aunque la relación causal, es decir el mecanismo, puede no estar idetnificado.

3. Definir los dominios de aplicabilidad: Deben quedar claros el rango de estructuras, propiedades fisicoquímicas, mecanismos y respuestas sobre las que el modelo QSAR puede generar predicciones fiables.
4. Apropriadas medidas de bondad de ajuste, robustez y predictividad: La bondad de ajuste se refiere a cómo el modelo define la variabilidad del endpoint o propiedad medida para los químicos probados. La robustez es una medida de cuánto cambiarán los coeficientes en el algoritmo si los cambios del modelo cambian. La predictividad implica determinar el potencial del modelo para hacer predicciones de elementos externos no incluidos en el conjunto utilizado para desarrollar el modelo.
5. Definir el mecanismo de acción: Siempre que sea posible debe asociarse el modelo QSAR a una interpretación acerca del mecanismo de acción.

### Estudios QSAR en sensibilización cutánea

El uso de parámetros fisicoquímicos puede ser objeto de la búsqueda de descriptores útiles en los modelos QSAR para compuestos sensibilizantes. En este sentido Kim JY[80], et al. han testado varias propiedades fisicoquímicas sin hacer distinción del mecanismo sensibilizante. Los parámetros analizados fueron: peso molecular, absorción cutánea, LogP(octanol/agua), punto de inflamación, punto de fusión, punto de ebullición, presión de vapor, recuento de dadores de puente de hidrógeno, recuento de aceptores de puente de hidrógeno, recuento de enlaces rotatable, área de superficie polar topológica, entalpia de fusión y entropía de fusión. Algunos de estos parámetros a priori, podría pensarse que tendrían cierta correlación con el potencial sensibilizante. Es el caso del logP ya que solventes con valores de logP < 4 se consideran tóxicos por

el potencial de disolver las membranas celulares. No obstante, los únicos parámetros que obtuvieron una correlación significativa con el potencial sensibilizante en LLNA fueron el punto de fusión, la tensión superficial y la combinación de ambos (Tabla 12).

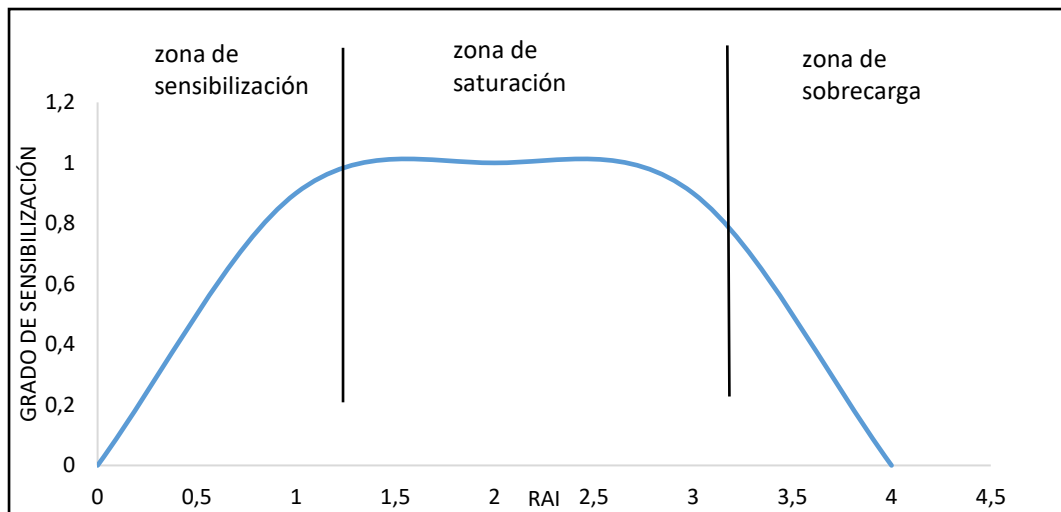
Propiedad química	Exactitud	Sensibilidad	Tasa de falsos negativos	Especificidad	Tasa de falsos positivos
PF	73%	72%	28%	77%	23%
TS	70%	71%	29%	69%	31%
PF + TS	75%	73%	27%	81%	19%

Tabla 12. Exactitud, sensibilidad, especificidad y tasas de falsos negativos y positivos del punto de fusión (PF) y tensión superficial (TS)

Otro descriptor utilizado para predecir el potencial sensibilizante de compuestos químicos es el denominado índice de alquilación relativa (RAI). Se trata de un descriptor que es función de la reactividad química, la liposolubilidad y la dosis administrada:

$$RAI = \log \frac{k \cdot D}{P + P^2}$$

Dónde k es una constante de reactividad que se puede medir in vitro para compuestos con el mismo mecanismo de reacción. D es la dosis utilizada y P es el coeficiente de lipofilia o coeficiente de reparto. La relación con el potencial sensibilizante de este descriptor sigue una distribución doble sigmoidea, de manera que aumenta proporcionalmente hasta alcanzar un máximo, y llegando a una zona de sobrecarga en la que el potencial sensibilizante disminuye al aumentar el IRA (Fig 22).



**Figura 22.** Relación IRAI vs Sensibilización cutánea.

En un análisis por subgrupos en función del mecanismo de reacción, Dearden JC, et al.[81] transforman el parámetro EC3 que se expresa en g/mL por su equivalente en unidades molares, el potencial de sensibilización cutánea (PSC) expresado en mmoles/L. De esta forma se evita que sustancias con un mismo potencial sensibilizante puedan terminar clasificándose en diferentes categorías en función de su peso molecular. El resultado de este estudio fue la generación de ecuaciones QSAR independientes para cada grupo de moléculas en función de su mecanismo de reacción. Los coeficientes obtenidos para el conjunto total de moléculas fueron inferiores a los obtenidos en cada subgrupo, lo que hace pensar que el modelo mecanístico se ajusta más a la realidad que un modelo global de sensibilización. De este modo se encuentran diferencias entre los diferentes grupos:

- Para las moléculas tipo base de Schiff, Sn2 y agentes acilantes la potencia depende de la reactividad y de la hidrofobia de la molécula.



- Para los aceptores de Michael y los electrófilos aromáticos SnAr los parámetros de reactividad química pueden ser útiles por sí mismos para generar modelos de potencia sensibilizante.
- Para los aceptores de Michael la reactividad y el área superficial potencian el poder sensibilizante.
- Las bases de Schiff verían aumentado su potencial sensibilizante por la polaridad y la flexibilidad molecular.
- Los electrófilos Sn2 requieren de cierta hidrofobicidad para aumentar su potencia. Así como, el carácter electrón-donante disminuye su potencia.
- La potencia sensibilizante de agentes acilantes dependería de la capacidad de formar enlaces de hidrogeno.

Una de las claves para el desarrollo de un modelo QSAR es la elección de los descriptores que pueden influir en el potencial sensibilizante (Tabla13)

<b>Mecanismo</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Descripción</b>
Aceptores de Michael	S4	E-state* del átomo 4
	HS17	E-state para el átomo de hidrógeno 17
	SlogP_VSA4	Suma de las áreas de superficie de van der Waals
	Vsurf_CW2	Descriptor de volumen, forma y área de superficie
	Max. BC1	Contribución máxima de enlace de uno
	Rel. PMI	Momento relativo principal de inercia
	S24	E-state del átomo 24

Pre-aceptores Michael	de	E1C3O2a	E-state de enlace simple entre oxígeno de éter y carbono aromático sustituido
		SsssNH	E-state para nitrógenos NH
		Vsurf_HB7	Capacidad de actuar como dador de H
		Av.IC2	Descriptor estructural (Average information content)
Base de Schiff		S7	E-state para el átomo 7
		S10	E-state para el átomo 10
		Vsurf_Wp7	Volumen polar (descriptor de forma volumen y área superficial)
		Av.SI2	Descriptor estructural (Average information content)
		Av.BO	Orden de enlace promedio
		Kier FI	Índice de flexibilidad de Kier
Sn2		S14	E-state para el átomo 14
		SsCH3	E-state para átomos de carbono – CH3
		Xvp9	Conectividad molecular de valencia de noveno orden
		eaC2C3a	E-state de enlace para enlace simple entre carbono no sustituido y carbono con 3 grupos aromáticos vecinos
		FASA-	Área superficial accesible fraccional con carga parcial negativa

	PEOE_VSA_FPOS	Área superficial positiva de van der Waals
	MNDO_HOMO	Energía del orbital molecular más alto
Agentes acilantes	S14	HE-state para el átomo de hidrógeno 14
	HS16	HE-state para el átomo de hidrógeno 16
	HS17	HE-state para el átomo de hidrógeno 17
	HS29	HE-state para el átomo de hidrógeno 29

**Tabla 13.** Descriptores utilizados por Dearden JC, et al. [81] para desarrollar ecuaciones QSAR en función del mecanismo de acción.

Uno de los descriptores más utilizados en estos modelos es el denominado E-state. Se trata de un factor que contiene información electrónica y topológica de un átomo de la molécula y se engloba dentro de la categoría 2D de la clasificación de los tipos de descriptores (Tabla14)[82].

Categoría	Definición
0D	Descriptores derivados de la fórmula química de las moléculas
1D	Descriptores moleculares derivados de la representación subestructural de fragmentos moleculares
2D	Se calculan en base a la representación gráfica de las moléculas que determinan el tipo de enlace y la interacción particular entre átomos
3D	Descriptores definidos en base a la representación geométrica o en 3D

4D	Descriptores que derivan de una representación esteroelectrónica o reticular
----	--

**Tabla 14.** Clasificación de los descriptores en modelos de estructura-actividad

El estudio y desarrollo de modelos QSAR permite generar herramientas informáticas que nos ayudan a la hora de realizar predicciones. Entre estas herramientas se encuentra la QSAR toolbox de la OCDE. Otro software interesante en este sentido es el Skinsensedb[83], que se trata de un base de datos pública que nos permita realizar predicciones, comparar con compuestos testados en Keratinosens, h-CLAT, DPRA y LLNA y establecer el porcentaje de similitud, etc.

### 1.3. Fármacos y reacciones de hipersensibilidad

Los medicamentos contienen sustancias activas (fármacos) y excipientes que pueden provocar eventos adversos. Las reacciones de hipersensibilidad son un tipo de reacción adversa (RAM) que se caracterizan por no ser predecibles ni dependientes de la dosis y se incluyen dentro del tipo B de la clasificación de las RAM (Tabla15)[84]

RAM	Características	Ejemplos
Tipo A (Augmented)	Dependen del mecanismo de acción	Hemorragias por anticoagulantes
<i>Efecto colateral</i>	Dependientes de la dosis	Bradycardia por betabloqueantes
<i>Efecto secundario</i>	Predecibles	Neutropenia por inmunosupresores
	Frecuentes	
	Baja mortalidad	
Tipo B (Bizarre)	No depende del mecanismo de acción	Agranulocitosis por metamizol
<i>Idiosincrasia</i>	Impredecibles	Anafilaxia por penicilinas
<i>Hipersensibilidad</i>	Infrecuentes	Síndrome de DRESS por carbamazepina
	Alta mortalidad	

Tipo C (Chronic)  <i>Tolerancia</i>	Relacionados con la dosis y duración del tratamiento	Supresión del eje hipotálamo-hipofisario por corticoides  Osteoporosis por corticoides
Tipo D (Delayed)  <i>Teratogenia</i>  <i>Carcinogenesis</i>	Ocurren tiempo después de finalizar el tratamiento	Focomelia por talidomida Defectos del tubo neural por carbamazepina  Linfoma por ciclofosfamida
Tipo E (End of treatment)	Ocurren tras la retirada brusca del fármaco	Síndrome de retirada de opioides  Síndrome de interrupción de ISRS

**Tabla 15.** Clasificación de las RAM

Las reacciones tipo A son predecibles, dependientes de la dosis y generalmente no son potencialmente mortales. En este tipo de RAM se encuentran los efectos secundarios, cuando el efecto adverso es derivado del efecto farmacológico del principio activo y los efectos colaterales cuando la RAM se debe a otros efectos que provoca el fármaco, no relacionados con el efecto farmacoterapéutico. Dentro de las reacciones de tipo B se encuentran las reacciones idiosincráticas que son reacciones anormales no relacionadas con el efecto farmacológico de la sustancia activa, no son predecibles y suelen estar relacionadas con alteraciones o variantes genéticas (deficiencias metabólicas o enzimáticas). Las reacciones de hipersensibilidad también pertenecen al grupo bizarro y ocurren por una respuesta anómala del sistema inmune en respuesta a una determinada sustancia. Se incluyen dentro de este grupo los 4 tipos de hipersensibilidad (I, II, III y IV).

## INTRODUCCIÓN

Se estima que la prevalencia de las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad a medicamentos supone un 18,7% de las consultas en los servicios de alergología y es la tercera consulta en frecuencia, precedido por la rinoconjuntivitis y el asma bronquial[85]. La mayoría de pacientes proceden derivados de la atención primaria (Tabla 16) y en la derivación por el especialista destacan especialidades como medicina interna, dermatología y también desde los servicios de urgencias (Tabla 17)

Procedencia	Frecuencia (%)
Iniciativa propia	5,5
Medicina de Familia	65,2
Pediatría primaria	6,0
Alergólogo	1,7
Otros especialistas	21,7

**Tabla 16.** Procedencia de los pacientes con alergia a medicamentos. Referencia Alergológica 2015

Especialidad	Frecuencia (%)
Anestesiología	6,2
Otorrinolaringología	1,8
Medicina Interna	10,5
Dermatología	8,8
Urgencias	14,9
Neumología	4,4
Otros	29

**Tabla 17.** Especialidades remitentes de pacientes por alergia a medicamentos. Referencia Alergológica 2015

La mayoría de las reacciones de hipersensibilidad se produjeron por un mecanismo inmediato y hasta un 30% fueron mediadas por mecanismos retardados. Los síntomas

más frecuentes son las reacciones cutáneas, la mayoría de ocasiones sin ningún síntoma asociado, destacando la urticaria como el síntoma más común. La anafilaxia se observa hasta en un 8% de pacientes[85].

En cuanto a los grupos de medicamentos que más frecuentemente provocan reacciones alérgicas se encuentran en primer lugar los betalactámicos, seguido de AINEs y otros antibióticos (Tabla18).

<b>Medicamento</b>		<b>Frecuencia</b>
Betalactámicos	Total	39.6
	Penicilina	8.7
	Amoxicilina	27.4
	Otros derivados de penicilina	0.9
	Cefalosporinas	3.4
	Ac. Clavulánico	11.7
	Carbapenemes	0.4
AINE		37
Pirazolonas		9.6
Anestésicos locales		5.3
Quinolonas		4.3
Sulfamidas		1.1
Macrólidos		3.2
Aminoglucósidos		1.1
Contrastes yodados		4.2
Tetraciclinas		0.2
Vitaminas		0.4

Hormonas	0.2
Hemoderivados	0.9
Anestésicos generales	0.8
Otros	17.7

*Tabla 18 Medicamentos más habituales causantes de reacciones de hipersensibilidad. Fuente: Alergológica 2015*

Los antibióticos beta-lactámicos son en frecuencia los medicamentos que más reacciones de hipersensibilidad provocan. Esta elevada incidencia puede estar marcada por ser fármacos ampliamente utilizados. Las reacciones que pueden provocar los antibióticos beta-lactámicos pueden ser de varios tipos:

- **Inmediata o acelerada:** La reacción inmediata se caracteriza por ocurrir en la primera hora tras la administración, mientras que la acelerada ocurre en las primeras 72 horas. Son reacciones de este tipo la urticaria, edema laríngeo, broncoespasmo, hipotensión, anafilaxia.
- **Retardada:** Cuando la reacción ocurre pasadas 72 horas tras la administración. En este caso también se dan casos de urticaria tardía, enfermedad del suero o rash
- **Otras reacciones tardías:** Síndrome de Stevens-Johnson, nefritis intersticial, vasculitis, anemia hemolítica, trombocitopenia.



### 1.4. Terapia oncológica dirigida. Fármacos anti-tirosina kinasa (tki)

La oncología es un área de la medicina en constante desarrollo, tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. En el ámbito farmacológico se ha avanzado mucho desde la quimioterapia clásica, hasta las nuevas terapias con dianas específicas que modulan puntos críticos tanto a nivel celular, como del ecosistema del propio tumor. Los fármacos de terapia dirigida son en general menos tóxicos que los fármacos antineoplásicos clásicos debido a la especificidad de su mecanismo de acción. Existen 58 receptores tirosina kinasa (RTK) en humanos que se clasifican en 20 familias

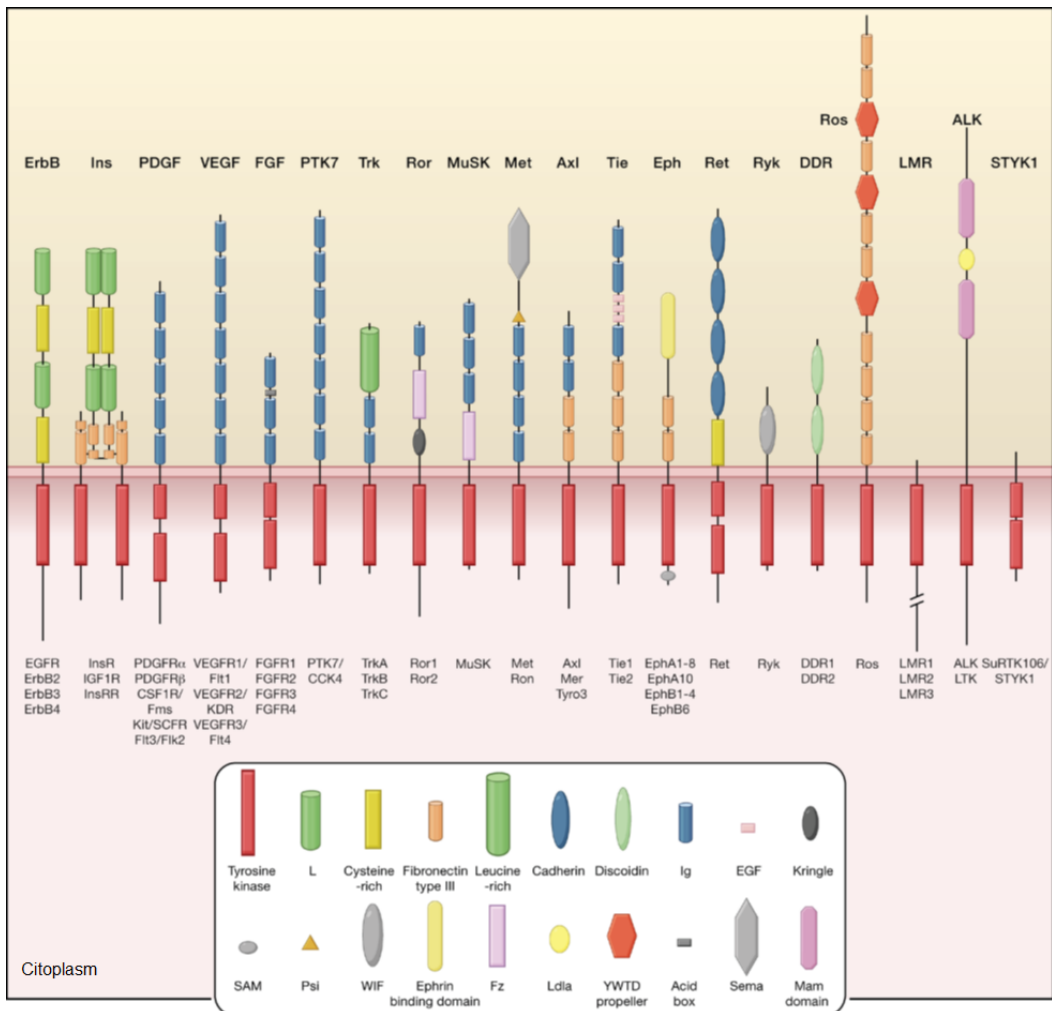
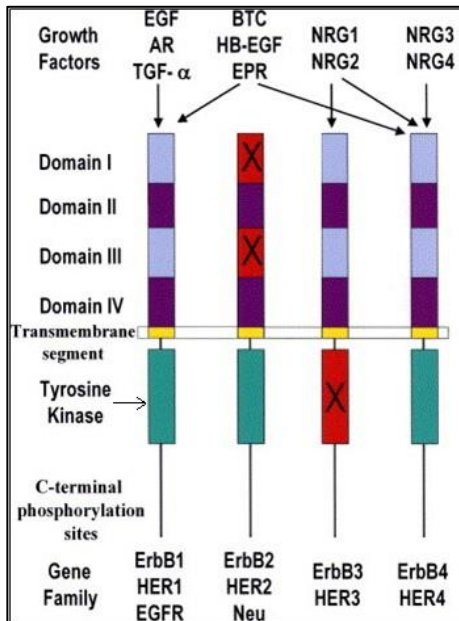


Figura 23. Familias de receptores tirosina kinasa. Modificado de Lemmon MA

(Fig23). Todos tienen una estructura similar que consiste una un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana y una región citoplasmática que contiene el dominio TK y el extremo carboxi-terminal [86].

**1.4.1. ERBB/EGFR/HER tirosina kinasas**

La familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico humano consta de cuatro tipos HER1-4 (Fig24) pertenecientes al linaje de proteínas *erbB*. La nomenclatura *erbB* deriva del oncogén de eritroblastosis viral aviar, mientras que la nomenclatura *ERBB/EGFR/HER* se utiliza para referirnos a la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico humano[87]. Estos receptores pueden formar hasta 28 hetero-



**Figura 24. Familia de receptores ERBB/HER/EGFR.** La parte extracelular de estos receptores consta de 4 dominios (I-IV). Los dominios I y III participan en la unión al ligando (excepto HER2, en el que el dominio II participa en la dimerización del receptor). El dominio tirosina quinasa de HER3 es inactivo. Modificado de Roskoski R

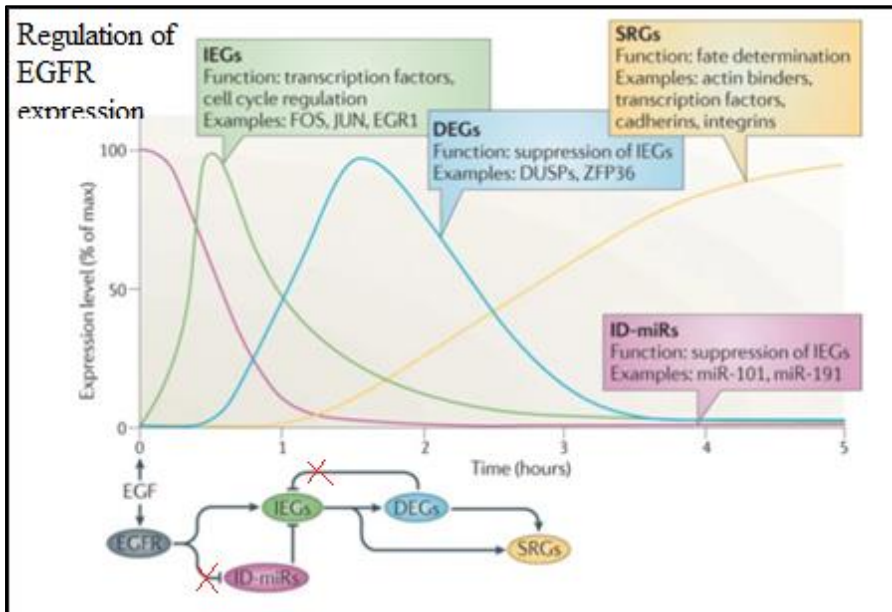
u homodímeros que tienen numerosos ligandos en función de la combinación. Existen hasta 614 combinaciones de estos receptores. Los homodímeros *erbB2/erbB2* y *erbB3/erbB3* no son funcionales[87]. Sin embargo, en condiciones patológicas de

sobreexpresión de HER2 pueden formarse homodímeros funcionantes. Fármacos como Trastuzumab serían más activos en condiciones de alta expresión de homodímeros HER2 [88].

El dominio intracelular de HER3 se ha considerado como una pseudoquinasa, sin capacidad de fosforilación. Sin embargo, parece que erbB3 tiene capacidad de autofosforilación, aunque con una capacidad 1000 veces menor que el dominio TK-EGFR [89]. También se produce transfosforilación mediante la vía de señalización PIK3/Akt. Además, la inhibición de esta señalización influye en la resistencia al tratamiento con fármacos TKI anti-HER[90]. La resistencia al tratamiento prolongado con fármacos anti-HER puede verse influenciada por la potenciación de la fosforilación de HER3 alcanzando un nuevo estado de equilibrio que disminuye la eficacia de los tratamientos si no se alcanzan dosis de inhibición completa[91]. Los genes ERBB humanos se encuentran en cuatro cromosomas diferentes. Las funciones principales son durante el desarrollo embrionario, ya que su ausencia resulta en muerte perinatal. También ejercen importantes funciones a nivel gastrointestinal, dérmico y pulmonar. ErbB2 y ErbB4 se expresan en el miocardio ventricular y participan en su desarrollo. La inhibición de Erbb3 en ratones provoca alteraciones en las válvulas aurico-ventriculares[87].

HER-1/erbB1/EGFR fue el primer receptor descrito de la familia erbB. Se trata de una glucoproteína de 170kd con funciones clave en el desarrollo, diferenciación y proliferación de tejido epitelial, mesenquimal y neuronal[92]. EGFR es un receptor transmembrana que se encuentra de forma constitucional como monómeros. La unión con ligandos provoca cambios conformacionales que favorecen la dimerización. En ausencia de ligando, los dominios II y IV se encuentran unidos e impiden la interacción con otros receptores. En presencia de EGF se induce un cambio conformacional que deja expuesto el dominio II (domino de dimerización) para la formación de dímeros [87]. Esta dimerización favorece la activación del dominio

intracelular TK. La activación de EGFR requiere de la fosforilación en uno o varios residuos del dominio TK. Este dominio TK activado por ligando forma un homodímero en el que se activa una quinasa que fosforila residuos tirosina de la quinasa activadora y que sirve como feedback negativo en la regulación de la expresión de erbB [87]. La regulación del EGFR es compleja y depende de señales de retroalimentación tempranas y tardías[93]. Los mecanismos tempranos incluyen; a) endocitosis de receptor inducida por ligando. b) Regulación por ubiquinización y desfosforilización. c) Regulación por fosforilaciones secundarias. d) Mecanismo dependiente de miARN [93]. Los mecanismos de regulación tardía implican la regulación de la transcripción. Se pueden diferenciar en 3 fases (Fig25)[93].



**Figura 25.** Mecanismos de regulación tardía de EGFR. Modificado de Avraham R

La primera fase sucede a los 45 minutos de la activación y consiste en la inducción de genes tempranos inmediatos (IEGs) que se inducen debido a la supresión de ID-miARN. Seguidamente se induce la transcripción genes tempranos retardados (DEGs) que inhiben la actividad de IEGs mediante la inducción de fosfatasa dual

específicas (DUSPs) que defosforilan MAPKs, que son las responsables de suprimir la actividad de IEGs.

### **1.4.1.1. Familia erbB y cáncer**

#### **1.4.1.1.1. Cáncer de pulmón**

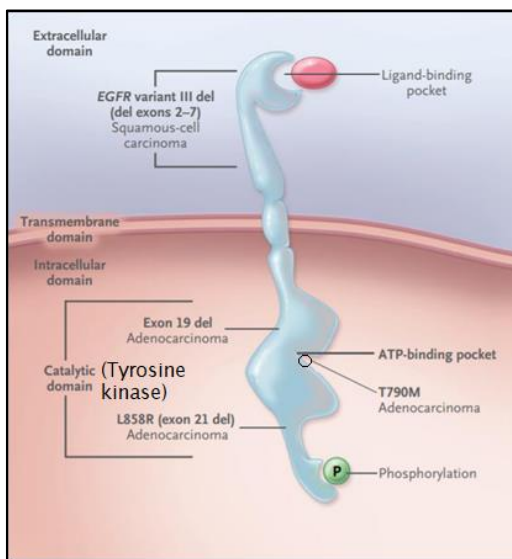
El cáncer de pulmón es uno de los más prevalentes tanto a nivel mundial como en España. Siendo la primera causa de muerte por cáncer en España en ambos sexos[94]. El cáncer de pulmón se clasifica en función de características histológicas y anatomopatológicas. El carcinoma de pulmón se puede clasificar en dos grandes grupos en función de la citología en; carcinoma de pulmón microcítico y Carcinoma de Pulmón de Celula No Pequeña (CPCNP) o no microcítico. El tipo más frecuente es el cáncer de pulmón no microcítico (85%) el cual se puede diferenciar en tres subgrupos histológicos con implicaciones en el tratamiento; adenocarcinoma, carcinoma de célula escamosa y carcinoma de célula grande[95]. Además de la clasificación histológica las últimas guías dan mayor importancia a la biología molecular de los distintos tumores. Destacando la detección de mutaciones en genes del EGFR, reordenamiento de ALK o ROS1[96]. La actualización de las recomendaciones sobre la determinación de biomarcadores de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) proponen realizar de manera obligatoria en pacientes con CPCNP avanzado las mutaciones de los genes EGFR y BRAF, los reordenamientos ALK y ROS1 y la expresión de PD-L1[97]. Las mutaciones del EGFR están presentes en el 8-11% de los pacientes con CPCNP avanzados y en el 16-18% de los adenocarcionmas de pulmón. Las mutaciones más frecuentes son las deleciones del exón 19 y mutaciones en el exón 21, que son mutaciones sensibles a los inhibidores de TK, que se utilizan como primera línea de tratamiento en las principales guías de tratamiento[98]. Además de estas mutaciones, existe otra mutación de resistencia relevante por su importancia clínica, la mutación T790M. Se trata de una sustitución en el exón 20 generalmente

adquirida en respuesta al tratamiento con fármacos anti-EGFR[98]. Otras alteraciones genéticas presentes en cáncer de pulmón son MET, KRAS y HER2(Tabla19)[95].

Anomalía	CPCNP		Cáncer de pulmón microcítico
	Célula escamosa	Adenocarcinoma	
Mutación KRAS	Muy raro	10-30%	Muy raro
Mutación BRAF	3%	2%	Muy raro
<u>EGFR</u>			
Dominio TK	Muy raro	10-40%	Muy raro
Amplificación	30%	15%	Muy raro
<u>HER2</u>			
Dominio TK	Muy raro	4%	Muy raro
Amplificación	2%	6%	No conocido
ALK fusión	Muy raro	7%	No conocido
<u>MET</u>			
Mutación	12%	14%	13%
Amplificación	21%	20%	No conocido
Amplificación TTF-1	15%	15%	Muy raro
Mutación p53	60-70%	50-70%	75%
Mutación LKB1	19%	34%	Muy raro
<u>PIK3CA</u>			
Mutación	2%	2%	Muy raro
Amplificación	33%	6%	4%

**Tabla 19.** Alteraciones genéticas más frecuentes en CPCNP (adenocarcinoma y cáncer de célula escamosa) y en cáncer de pulmón microcítico

Las principales mutaciones de EGFR implicadas en cáncer de pulmón se localizan en el dominio TK. La mayoría de las mutaciones implican deleciones en el exón 19 o mutaciones del residuo L858R del exón 21. La mutación T790M implica a un aminoácido localizado en la región de unión al ATP del dominio TK. Existen mutaciones localizadas en la región extracelular del EGFR que se asocian al desarrollo de cáncer de célula escamosa[95](Fig26)



**Figura 26.** Principales mutaciones del EGFR implicadas en el desarrollo de cáncer de pulmón. Modificado de Herbst RS

### 1.4.1.1.2. Cáncer de mama

El cáncer de mama es una patología heterogénea con diferentes tipos histológicos, hormonales y moleculares que van a marcar el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad. Histológicamente se clasifican principalmente en carcinomas ductales y carcinomas lobulillares que pueden ser in situ o infiltrantes. Otros tipos histológicos minoritarios son los mucinosos, papilares, medulares, tubulares y adenoquísticos. Además de las características histológicas, el cáncer de mama se clasifica en función del estado hormonal y molecular, diferenciando 4 tipos de tumores. Los parámetros

que marcan esta clasificación son el estado del receptor de estrógenos y progestágenos; el estado de HER-2 y la expresión de ki67(Tabla20)[99]

Subtipo	Fenotipo IHQ	Características moleculares
Luminal A	ER + PR+ (>20%) HER2- Ki67 bajo (<14%)	Mutaciones en PI3KCA y GATA3
Luminal B	ER+ PR- (<20%) HER2+ ó Ki67 >14%	Similar a luminal A pero con mayor prevalencia de TP53 y RB
HER-2 sobreexpresado	ER- PR- HER2+	Alta expresión de genes HER2 y baja de genes ER
Triple Negativo (TN)	ER- PR- Her2-	Mutaciones en TP53. Pérdida de RB1 y BRCA1. Alta activación de PIK3/AKT

**Tabla 20.** Clasificación y características moleculares del cáncer de mama. ER: Receptor de estrógenos, PR: Receptor de progestágenos, RB: Genes de proteína de retinoblastoma

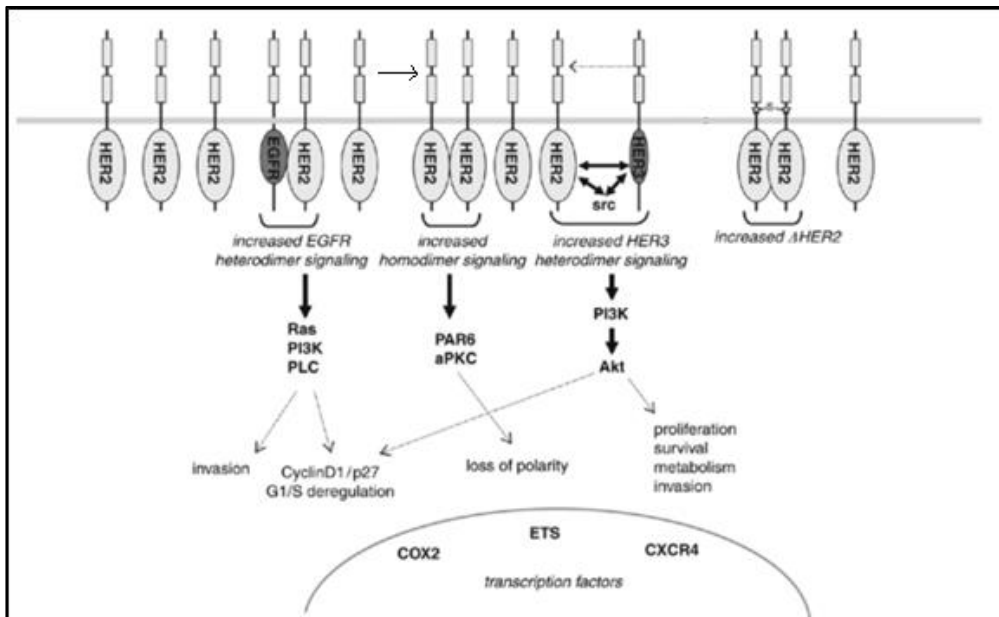
El cáncer de mama luminal es el más heterogéneo en cuanto a expresión génica, alteraciones en el ADN y pronóstico de los pacientes. En este tipo de cáncer aparece con gran frecuencia mutaciones en PIK3CA, MAP3k1 y MAP2K4 y altos niveles de la proteína MYB. El subtipo HER+ puede subdividirse en 2 subgrupos; a) Grupo HER-2 puro, que se asocia a amplificación de HER-2 y b) Grupo HER-2 luminal que presenta expresión de genes de tipo luminal[99,100] La sobreexpresión de HER-2



## INTRODUCCIÓN

juega un papel importante en la tumorigenesis en el cáncer de mama, pudiendo expresarse entre 25 y 100 veces más que en una célula normal[101]. En modelos animales se han visto algunas mutaciones en el gen HER2 que inducen la generación de tumores. Sin embargo, polimorfismos en el gen humano análogo de *neu* no parecen aumentar el riesgo de cáncer de mama. El mecanismo por el que se produce la tumorigenesis es un aumento en la formación de dímeros HER2-HER2, que inducen pérdida de la polaridad. El aumento de dímeros HER2-EGFR aumentan la proliferación y el potencial invasivo. El aumento de dímeros HER2-HER3 también conlleva un aumento de la supervivencia y de las funciones proliferativas invasivas y metabólicas[101]

Otro factor implicado en el desarrollo tumoral de varios tipos de cáncer incluido el de mama y el de pulmón son las proteínas src kinasas. Estas proteínas son segundos mensajeros que cuando están activadas constitutivamente aumentan el riesgo de tumorigenesis tanto en tumores HER2+ como HER2(Fig27)[101].



**Figura 27.** Mecanismos de inducción de tumorigenesis mediados por sobreexpresión de HER2. Modificado de Moasser MM

Existen genes de susceptibilidad asociados a cáncer ovárico y cáncer de mama; BRCA1 y BRCA2. Mutaciones en estos genes se asocian a tumores en pacientes jóvenes y con historia oncológica familiar de tumores ováricos y de mama. Estos genes codifican proteínas cuya función es la reparación del ADN de cadena doble, y la identificación de estas mutaciones es importante para definir actuaciones profilácticas como la mastectomía y la salpingooforectomía bilaterales, dado el riesgo de aparición de tumores y de recurrencia bilateral en estas pacientes[87] Los mecanismos de desarrollo de tumores provocados por mutaciones en los genes BCRA1 y BCRA2 se detallará en un apartado específico.

### **1.4.1.1.3. Otros tipos de Cáncer**

Los receptores de la familia erbB tienen implicación en la generación de múltiples tumores. En las secciones anteriores se han revisado los más estudiados y con mayor repercusión en la práctica clínica. Otro de los tumores con implicaciones terapéuticas en función del estado mutacional del EGFR es el cáncer de páncreas. El cáncer pancreático se caracteriza por su baja supervivencia dada la agresividad y rápida extensión del tumor, siendo resecables al diagnóstico solo el 15-20% de los tumores[102]. El estado mutacional de K-RAS es el que parece tener mayor implicación en el desarrollo del cáncer pancreático, presentes en la mayoría de los tumores pancreáticos[103,104]. La sobreexpresión de EGFR se asocia con mayor riesgo de progresión y metástasis[105]. La inhibición del EGFR tiene aplicación en la clínica ya que aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer metastásico cuando se asocia erlotinib al tratamiento clásico con gemcitabina[106].

El cáncer gástrico presenta sobreexpresión de HER2 en aproximadamente el 20% de los tumores diagnosticados. Esto añade la posibilidad de añadir fármacos antiHER2 al tratamiento citotóxico clásico y quirúrgico, siendo este último, la principal arma terapéutica con intención curativa[87,107].

Otros tipos de cáncer en los que la sobreexpresión de EGFR tiene implicaciones en el desarrollo tumoral y en terapéutica son el cáncer colorrectal y el cáncer de cabeza y cuello. La amplificación de EGFR en cáncer colorrectal marca la respuesta a anticuerpos anti-EGFR como cetuximab o panitumumab. Además, mutaciones en KRAS son un factor predictivo de resistencia al tratamiento con estos fármacos.[108,109]. El cáncer de cabeza y cuello representa un 5% de los tumores diagnosticados en España. El tratamiento tiene un abordaje quirúrgico, radioterápico y quimioterápico en función del estadio de la enfermedad y del tipo de paciente. Cetuximab está aprobado como coadyuvante de la radioterapia en cáncer localmente avanzado y asociado a platino en enfermedad metastásica y/o recurrente[110].

### **1.4.2. Familia de receptores VEGF**

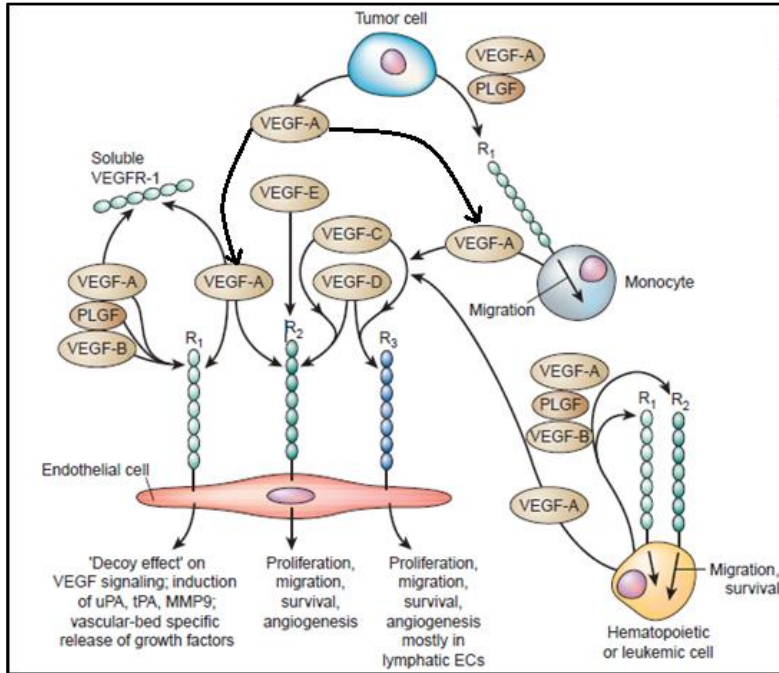
El factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF) tiene la capacidad de promover el crecimiento vascular de células endoteliales derivadas de arterias, venas y vasos linfáticos, con una potente respuesta angiogénica documentada en modelos in vivo. Además de este efecto, se han documentado numerosos efectos farmacológicos inducidos por VEGF, como, inhibición de la apoptosis mediante la vía de la PI3k-Akt. También se ha reportado la inducción de la proteína antiapoptótica bcl-2 en células endoteliales mediante la actividad de VEGF. VEGF también tiene efectos en células derivadas de la médula ósea. Sobre los macrófagos promueve la quimiotaxis e induce la formación de colonias de mediante la estimulación de progenitores granulocíticos [111]. La actividad de VEGF tiene efecto inhibitorio sobre la maduración de células dendríticas [112]. Sobre el sistema vascular VEGF favorece la permeabilidad e induce la fenestración vascular, con potencial para provocar sangrados. Otros efectos farmacológicos, observados en modelos animales de VEGF son la hipotensión, taquicardia paroxística y disminución del gasto cardiaco [111].

Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 están compuestos por 7 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y un dominio intracelular tirosin kinasa. El VEGFR3 es un receptor de la misma familia (Flt-4 “fms-like-tyrosine kinase-4”), con afinidad sólo por algunas isoformas de VEGF (VEGFC y VEGFD)[111]. Los receptores VEGFR1 y VEGFR2 se expresan en la superficie de la mayoría de las células endoteliales sanguíneas. Mientras que VEGFR3 se expresa sólo en las células endoteliales linfáticas.

El receptor VEGFR1 es codificado por el gen Flt-1 y fue el primer receptor tirosin kinasa identificado como receptor de VEGF. Las funciones del VEGFR1 dependen del tipo celular en el que se expresen, como, en células derivadas de la médula ósea o en células endoteliales. Por ejemplo, en precursores hematopoyéticos que expresan VEGFR1 se ha demostrado un efecto pro-metastásico ya que su expresión favorece el nicho metastásico e influye en el destino de las células neoplásicas [113]. VEGFR1 tiene alta afinidad por VEGF, sin embargo, tiene un efecto señuelo mediante la inducción de varios factores de crecimiento. Por sí mismo VEGFR1 no tiene efectos mitogénicos en las células endoteliales y podría tener un efecto inhibitorio indirecto mediante el “secuestro” de VEGF, disminuyendo así su unión a VEGFR2 (Fig28). Además, en situaciones patológicas se ha evidenciado una potenciación de VEGF con PLGF (Factor de crecimiento placentario) con aumento de la tumorigénesis y el sangrado vascular [114].

El receptor VEGFR2, también conocido como KDR (kinase domain región) se une con una afinidad mucho más baja a VEGF que el VEGFR1, sin embargo, su capacidad de autofosforilación es mucho mayor [115]. VEGFR2 se activa mediante dimerización y fosforilación mediante tirosina cuando se une a su ligando y tiene efectos mitogénicos, quimiotácticos y de señalización de supervivencia celular. La unión de VEGF a VEGFR2 induce la fosforilación de varias proteínas en las células endoteliales. Entre estas proteínas se encuentran la fosfolipasa C- $\gamma$ , PI3K, RAS y

proteínas de la familia Src [111]. VEGF tiene implicaciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario y el desarrollo postnatal. También se han demostrado implicaciones en el crecimiento longitudinal del hueso y en la formación endocondral del hueso [116].



**Figura 28.** Funciones de los receptores de VEGFR (VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3) e interacción con las distintas isoformas de VEGF. Se muestra el efecto señuelo “decoy effect” del VEGFR1 mediante la inducción de uPA, tPA, MMP9; vascular-bed specific release of growth factors. VEGFR favorece la proliferación, migración y la supervivencia celular y la angiogénesis. VEGFR3 tiene efectos proliferativos en las células endoteliales linfáticas. VEGFR1 y VEGFR2 favorecen la migración y supervivencia de células hematopoyéticas. Modificado de Ferrara M .

### 1.4.2.1. Implicaciones patológicas de VEGF

La alteración de las condiciones fisiológicas de VEGF y sus receptores tiene implicaciones patológicas en enfermedades como el cáncer. En tumores sólidos humanos se ha demostrado el aumento de mRNA de VEGF [117]. Esta desregulación de VEGF se ha demostrado en varios tumores como hemangioma, glioblastoma

multiforme, melanoma, mama, pulmón, cabeza y cuello, ovario, tracto gastrointestinal y carcinomas renales [118]. Los macrófagos tienen importancia en la patogénesis de numerosos tumores potenciando la angiogénesis. La migración de monocitos y la inducción de la angiogénesis está dirigida por el receptor de VEGFR1 [119]. La implicación de los mecanismos que favorecen la angiogénesis se ha traducido en el desarrollo de fármacos con indicaciones en múltiples tumores sólidos. Además, VEGF se expresa en células derivadas de neoplasias hematológicas como mieloma múltiple, linfoma de células T, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Burkitt y leucemia mieloide crónica. En las células leucémicas es más frecuente la expresión de VEGFR1 que VEGFR2 [111].

### **1.4.3. Proteína quinasa BCR-ABL1**

La proteína quinasa BCR-ABL1 es una proteína de fusión quimérica codificada por un cromosoma anómalo que se genera por una translocación recíproca [t(9;22)(q34;q11)] entre el gen ABL en el cromosoma 9 y el gen BCR en el cromosoma 22 (Fig29). El producto de esta translocación es una proteína aberrante con actividad tirosina quinasa constitutiva que juega un papel fundamental en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica (LMC) y también puede aparecer en otro tipo de neoplasias hematológicas, como en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) [120,121]. La implicación directa en la etiología de esta proteína de fusión anómala llevó a realizar amplios esfuerzos por caracterizar la estructura macromolecular de la misma y buscar compuestos químicos que inhibieran su actividad. Así surge el primer inhibidor de tirosina quinasa comercializado, imatinib, que mostró excelentes resultados en el curso de la LMC, consiguiendo alcanzar una esperanza de vida que se asemeja a la población general [122].

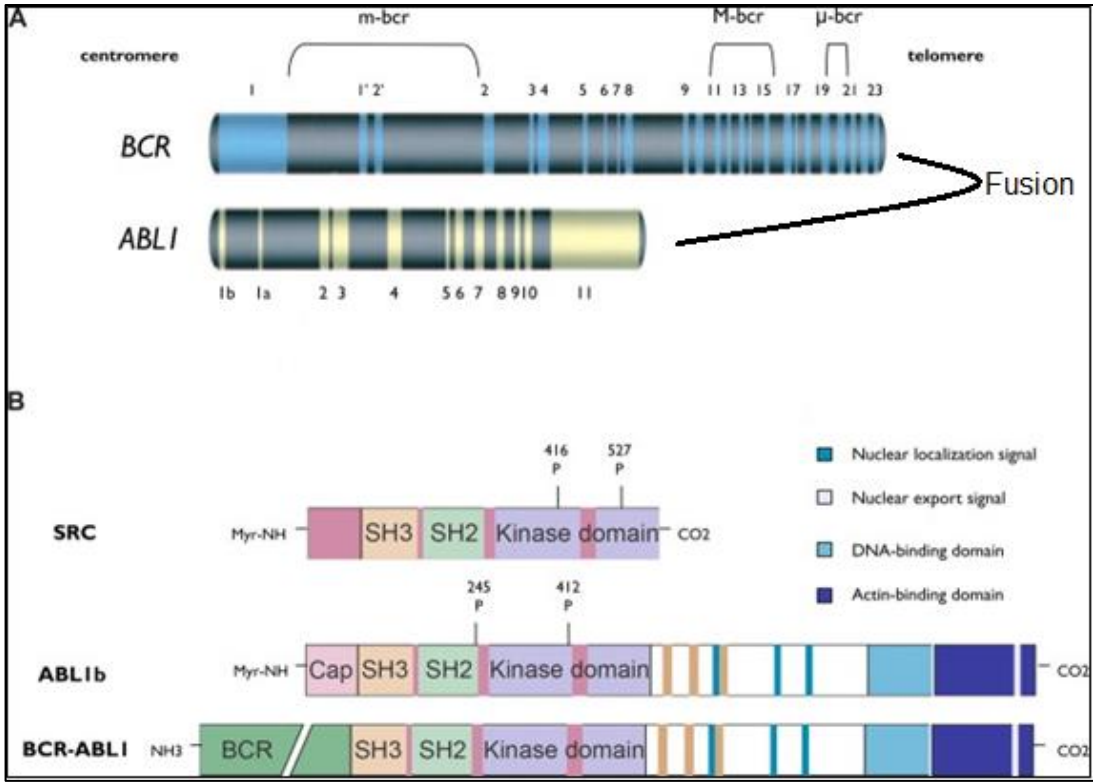


Figura 29. Representación esquemática de los genes ABL1 y BCR y de la proteína BCR-ABL1 quinasa. (A) Se muestran los genes BCR y ABL1. (B) Se muestra la estructura de las proteínas SRC y ABL1. Se puede apreciar la similitud del cuerpo central de la proteína (42% de homología) donde se engloba el dominio tirosina quinasa. Modificado de Quintanas-Cardama A.

El descubrimiento de imatinib supuso una revolución en el tratamiento de la LMC y del cáncer y supuso el inicio de los tratamientos dirigidos frente a receptores tirosina quinasa que tienen implicación en el desarrollo de otros tipos de cáncer. Se han desarrollado varios inhibidores de BCR-ABL posterior a imatinib con perfiles de potencia y toxicidad diferentes. Los inhibidores del BCR-ABL1 son inhibidores multiquinasa con distintos perfiles (Fig30.[123]).

	Bosutinib	Dasatinib	Imatinib	Nilotinib	Ponatinib
<b>ABL</b>	100	105	83	98	101
<b>ARG</b>	99	102	68	95	100
<b>BRAF</b>	16	91	23	41	89
<b>BTK</b>	97	102	-1	45	95
<b>DDR1</b>	97	101	98	103	101
<b>DDR2</b>	96	101	93	102	101
<b>EGFR</b>	100	102	4	17	97
<b>EPHA1</b>	3	101	9	61	97
<b>EPHA2</b>	99	99	6	95	102
<b>FGFR1</b>	79	47	-1	-29	101
<b>FGR</b>	92	103	28	55	101
<b>FLT3</b>	77	17	68	60	99
<b>FMS</b>	93	100	22	52	101
<b>FYN</b>	95	100	30	59	101
<b>HCK</b>	89	100	13	73	98
<b>HER2</b>	88	21	7	4	88
<b>HER4</b>	102	103	52	73	101
<b>ITK</b>	13	2	-2	0	86
<b>JAK1</b>	-2	9	-1	13	99
<b>JAK2</b>	64	68	0	19	92
<b>KIT</b>	23	100	97	96	101
<b>LYNa</b>	93	100	76	85	100
<b>LYNb</b>	94	102	76	85	103
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	77	100	98	103	103
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	95	99	91	93	102
<b>SIK</b>	100	99	-7	-25	96
<b>SYK</b>	100	69	16	54	10
<b>TEC</b>	58	101	-3	0	79
	<25%	25-49%	50-75%	>76-100%	

**Figura 30.** Actividad relativa de los inhibidores del BCR-ABL frente algunas quinasas. Los colores muestran el porcentaje de inhibición. Modificado de GELM.

Los diferentes perfiles de inhibición de quinasas de estos fármacos van a influir en sus características farmacológicas y toxicológicas. Dasatinib y nilotinib son los itk de segunda generación y tienen mayor potencia y producen respuestas más rápidas y



profundas que imatinib. Ponatinib y bosutinib son fármacos de 3º generación que se reservan para pacientes con resistencia a los itk de generaciones anteriores. Ponatinib es el único fármaco activo frente a la mutación T315I del BCR-ABL1 que confiere resistencia a otros tratamientos. Son tratamientos generalmente bien tolerados, con reacciones adversas generalmente leves como alteraciones cutáneas, fatiga, calambres musculares y diarrea. No obstante, cada fármaco va a tener un perfil de reacciones adversas característico (Tabla21) entre los que destaca, por su gravedad y frecuencia, el derrame pleural asociado al tratamiento con dasatinib que es dosis dependiente[123].

Fármaco	RAMs
Imatinib	Alteraciones gastrointestinales Alteraciones del metabolismo fosfocálcico
Dasatinib	Derrame pleural Trombopenia
Nilotinib	Eventos cardiovasculares: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elevación presión arterial</li> <li>• Prolongación QT</li> <li>• Isquemia arterial</li> </ul> Hiperglucemia
Ponatinib	Diarrea Alteraciones hepáticas

Bosutinib	Aumento riesgo cardiovascular Alteraciones hepáticas
-----------	---

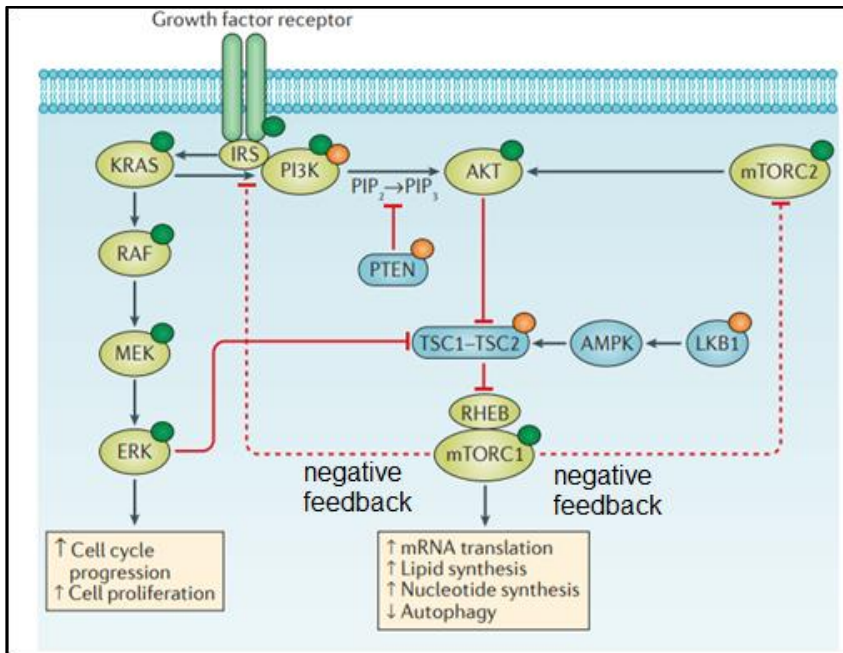
**Tabla 21.** Perfil de RAMs de los inhibidores del BCR-ABL

#### 1.4.4. Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR

La vía intracelular de señalización PI3k/AKT/mTOR controla procesos biológicos como el metabolismo, la motilidad, crecimiento y proliferación celular. Es una vía constitutiva presente en muchos tipos celulares y su desregulación tiene implicación en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades metabólicas y neuropsiquiátricas[124,125].

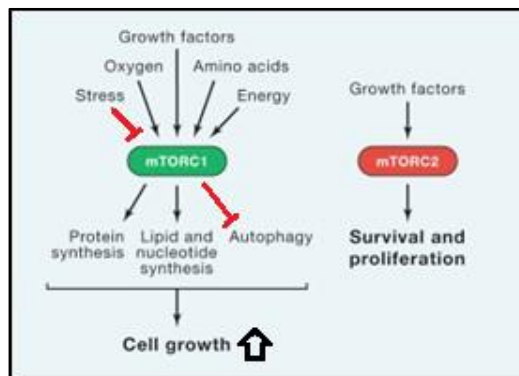
La activación de la vía comienza mediante la interacción de un sustrato con un receptor tirosina quinasa. El sustrato que inicia la vía pueden ser numerosas citoquinas, factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La unión del sustrato al receptor provoca la dimerización y la fosforilación cruzada de los residuos de tirosina quinasa intracelulares. Las proteínas PI3K son reclutadas por proteínas adaptadoras como la familia de proteínas del receptor sustrato de insulina (IRS). Este complejo provoca la fosforilación del del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). El PIP<sub>3</sub> es un mensajero secundario que activa la proteína AKT que es capaz de fosforilar TSC1 y TSC2 y provocar la disociación del complejo TSC1-TSC2. El complejo TSC1-TSC2 regula negativamente la actividad de mTOR, por lo que, AKT conlleva la activación del complejo 1 de mTOR (mTOR1) y en última instancia se aumenta la síntesis de proteínas y lípidos y disminuye la autofagia, lo cual favorece la proliferación celular[125]. La proteína

supresora de tumores (PTEN) es una fosfatasa específica que es capaz de inactivar AKT (Fig31) [126].



**Figura 31.** Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR. Modificado de Janku F

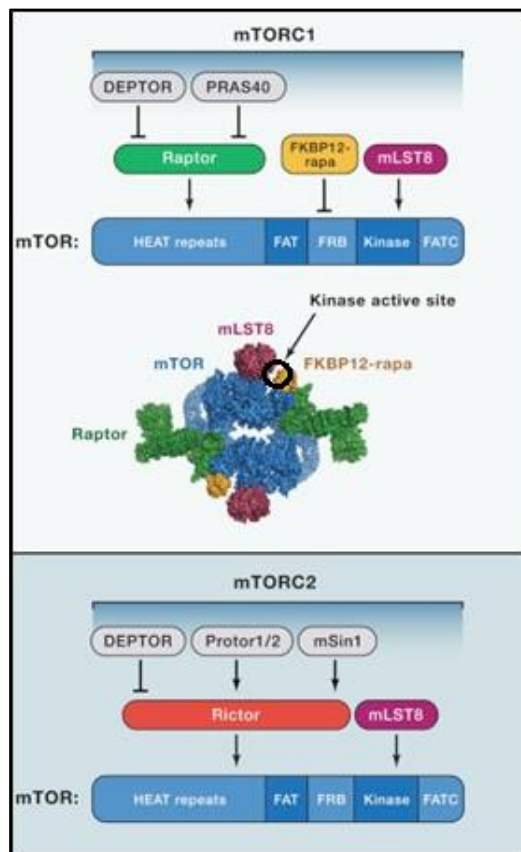
La proteína mTOR es una quinasa serina/treonina relacionada con la vía de PI3K que forma una subunidad catalítica en dos complejos proteicos distintos mTOR1 y mTOR2 (Fig32). [127]



**Figura 32.** Vías de señalización de mTOR1 y mTOR2. Modificado de Saxton RA

## INTRODUCCIÓN

El complejo mTOR1 está formado por las proteínas mTOR, Raptor (regulatory protein associated with mTOR) y mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8). Raptor facilita el reclutamiento del sustrato al complejo y mLST8 asociado al dominio catalítico tiene una función estabilizadora del complejo activado. Además de estos tres componentes el complejo mTOR1 contiene dos subunidades inhibitorias PRAS40 ((proline-rich Akt substrate of 40 kDa) y DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein). El complejo mTOR2 contiene también mTOR y mLST8, pero difieren la proteína Rictor que se caracteriza por ser insensible a rapamicina y de ahí su nombre “rapamycin insensitive companion of mTOR”. No obstante, aunque rictor es insensible a rapamicina, el tratamiento prolongado con rapamicina puede llegar a inhibir la señalización de mTOR2(Fig33) [127].



**Figura 33.** Componentes de los complejos mTOR1 y mTOR2. Modificado de Saxton RA

Las funciones de los complejos mTOR1 y mTOR2 son diferentes. El complejo mTOR1 favorece la síntesis de novo de lípidos y nucleótidos y favorece la glucólisis y la incorporación de nutrientes a las células. Además, favorece la síntesis de proteínas. Mientras que mTOR1 regula el crecimiento celular y el metabolismo, mTOR2 controla la proliferación y la supervivencia celular. Sin embargo, la función más importante de mTOR2 es la fosforilación de Akt, que una vez activado favorece la supervivencia, proliferación y crecimiento celular [127]. Además, de la función metabólica mTOR tiene otras funciones. En el sistema inmune favorece la proliferación celular de linfocitos T, lo cual tiene aplicaciones terapéuticas, mediante los inhibidores de mTOR que se utilizan en la prevención del rechazo de trasplantes tanto de órgano sólido como hematológico por sus propiedades inmunosupresoras.[127].

### 1.4.4.1. Implicaciones de la vía PIK3/AKT/mTOR en cáncer

El rol de la vía PIK3 en la tumorigenesis está bien establecido debido a su asociación con oncoproteínas. PTEN actúa como gen supresor de tumores debido a su capacidad de inhibir la vía PI3K. Además, existen numerosas mutaciones en esta vía que se relacionan con el desarrollo de cáncer (Tabla22)

Mutación	Tipo de cáncer	Frecuencia (%)
PIK3 $\alpha$		
Mutaciones	Mama	26-41
	Colon	15-21
	Vejiga	20-23
	Endometrio	35-53
	Pulmón	15-16

Amplificación	Pulmón	38-47
	Ovario	18-29
	Oroesofágico	23
	Próstata	22
PTEN		
Mutación o deleción	Endometrio	65
	Glioblastoma	31-41
	Próstata	7-39
MTOR		
Mutación	Endometrio	11
	Colorrectal	8
	Melanoma	7

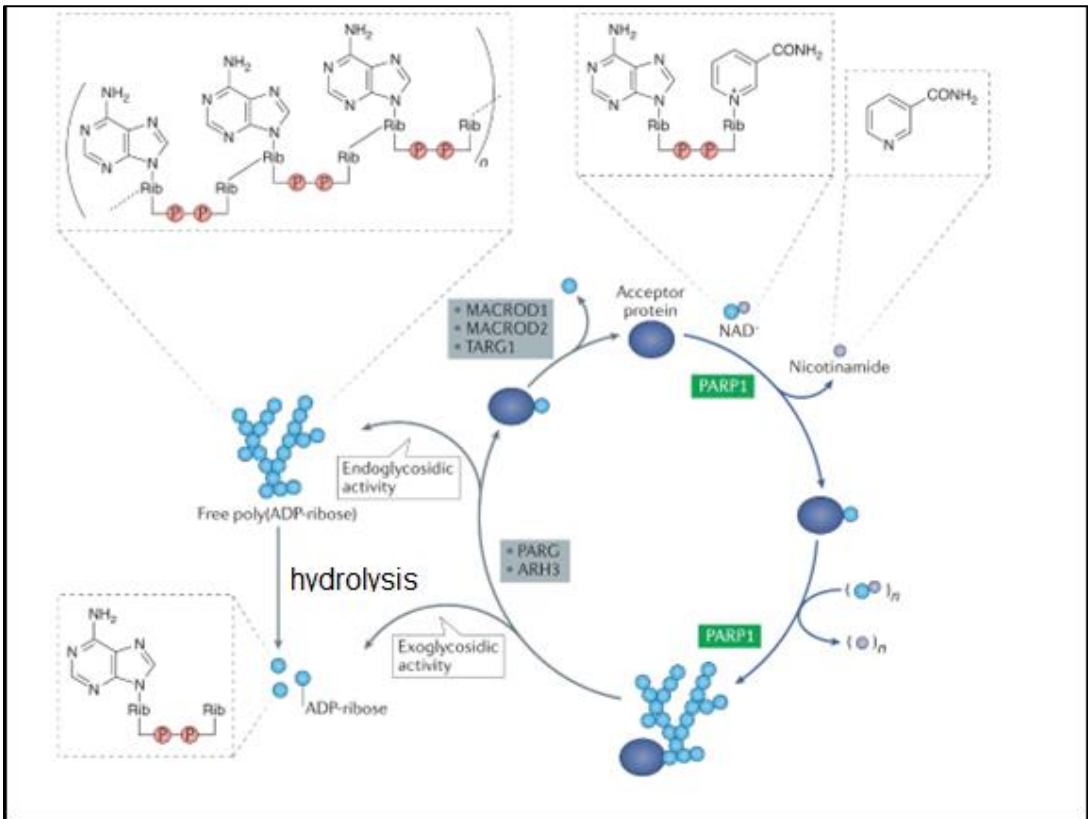
**Tabla 22.** Alteraciones genéticas de la vía PIK3/AKT/mTOR en cáncer.

El gen que codifica para la subunidad p110 $\alpha$  de PI3K está amplificada en muchos tipos de cáncer como cáncer cervical, gástrico y de pulmón. En algunos tipos de cáncer como en tumores cerebrales, colon o cáncer de mama se han identificado mutaciones de p110 $\alpha$ [128]. Estas mutaciones aumentan la actividad de PIK· in vitro y potencian la actividad de AKT incluso en ausencia de estimulación de factores de crecimiento. Además, existe un feedback negativo de regulación de PI3K mediante la activación de mTOR-raptor. La activación del complejo mTOR-raptor provoca que en tratamientos prolongados con rapamicina u otro inhibidor de mTOR se produzca un aumento paradójico en la actividad AKT disminuyendo la actividad antitumoral[129]. Estos hechos convierten esta vía en una importante diana farmacológica para el tratamiento de ciertos tumores con mutaciones en la misma,

sobre todo los tumores con mutaciones en PIK3. El tratamiento con inhibidores de PIK3 ya se utiliza en algunos tumores de mama y como esta vía participa en múltiples procesos celulares, incluyendo efectos metabólicos, la inhibición de esta vía provocará una disminución de sensibilidad a la insulina.

### 1.4.5. Inhibición PARP

En la génesis del cáncer intervienen muchos factores, tanto genéticos como ambientales. El organismo tiene mecanismos para detectar errores durante la replicación del ADN en los procesos de división celular. Cuando hay errores en las proteínas encargadas de detectar estos errores y repararlos pueden aparecer procesos tumorales y otras enfermedades. Es frecuente que las células tumorales sean capaces de evadir estos mecanismos de reparación, lo cual conduce a la generación de tumores. La proteína PARP “protein poly(ADP-ribose) polymerase” tiene como función detectar y reparar errores durante la replicación del ADN. En concreto, es capaz de reparar roturas de hebra doble y de hebra única y errores por escisión de bases.[130] Hay hasta 17 tipos de proteínas PARP, pero sólo PARP1, PARP2 y PARP3 se han asociado a la inducción por daño en el ADN y por estar relacionados con la reparación del mismo. PARP cataliza la transferencia de residuos ADP ribosa desde  $\text{NAD}^+$  a sustratos diana, contruyendo una cadena poli(ADP-ribosa) (PAR) (Fig34)[131]. PARP1 escinde  $\text{NAD}^+$  en ADP-ribosa y nicotinamida, y une covalentemente ADP-ribosa a una proteína aceptora. Se pueden escindir moléculas  $\text{NAD}^+$  adicionales y construir formas lineales y ramificadas de PAR. Dos enzimas, la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG) y ADP-ribosilhidrolasa 3 (ARH3) desempeñan un papel central en la degradación de PAR a través de sus actividades exoglicosídicas y endoglicosídicas. Las glicohidrolasas ADP ribosa MACROD1, MACROD2 y TARG1 actúan sobre péptidos mono(ADP-ribosil)ados generados por PARG.[132]

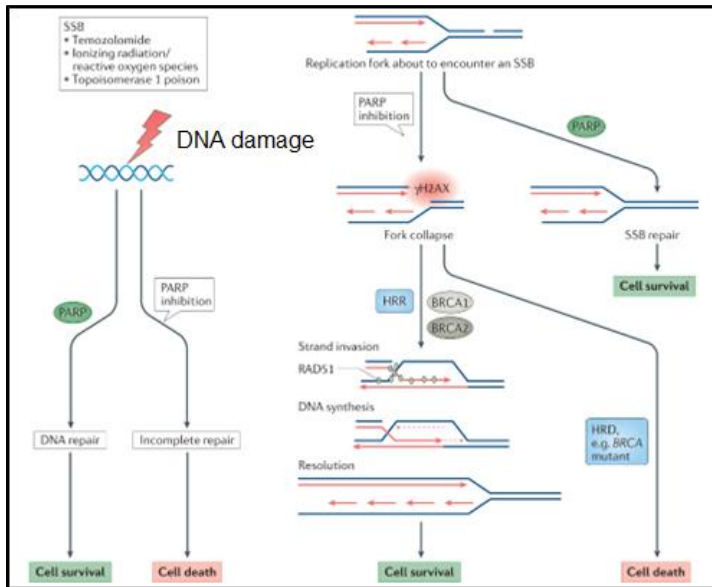


**Figura 34.** Procesos de acumulación de poli(ADP-riosa) y degradación de PAR. Modificado de Curtin NJ

Cuando PARP1 funciona normalmente, el polímero de ADP-riosa cargado negativamente repele el ADN cargado también negativamente, evitando errores de recombinación en los sitios de rotura del ADN. Algunos estudios sugieren que la falta de reparación de roturas de cadena simple endógenas conduce al colapso de la horquilla de replicación y la activación de la reparación por recombinación homóloga[133]. Estos descubrimientos condujeron a la hipótesis de que las células carentes de mecanismos de reparación de cadena simple (carentes de PARP1) son dependientes de la reparación por recombinación homóloga. De igual manera, las células carentes de reparación por recombinación homóloga son dependientes de



PARP1. Esta hipótesis fue importante en el desarrollo de la terapia para el cáncer debido al papel de los genes supresores de tumores BRCA1 y BRCA2 que tienen funciones clave en el mecanismo de reparación por recombinación homóloga (Fig35) [134].

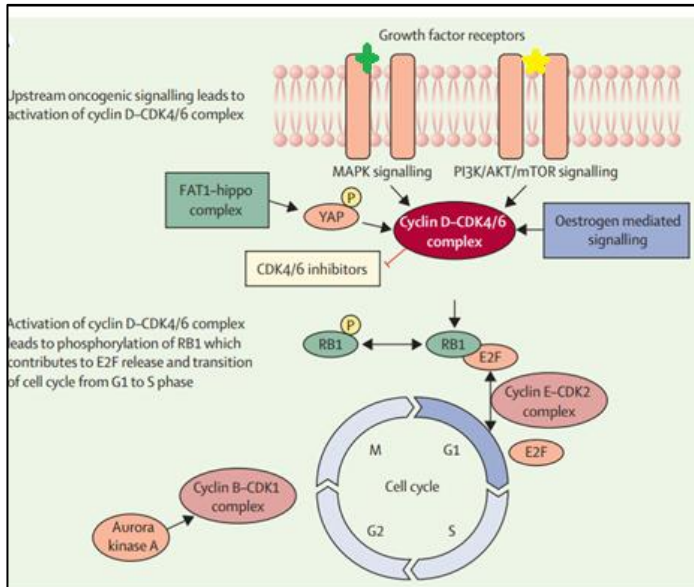


**Figura 35.** Modo de acción de los inhibidores de PARP en quimiosensibilización y radiosensibilización (izq) y mecanismo de acción de inhibidores PARP en modelo de letalidad sintética en recombinación homóloga. HRR: Reparación por recombinación homóloga; SSB: Rotura de cadena doble. Modificado de Curtin NJ.

### 1.4.6. Ciclinas dependientes de quinasa 4 y 6 (CDK4/6)

La transición de la fase G1 del ciclo celular y el paso a la fase S y de división celular, está modulada por una compleja red de proteínas reguladoras. Entre estas proteínas se encuentra la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (RB1). RB1 es un regulador negativo crucial de la célula, que actúa a través del ensamblaje de complejos multiproteicos que previenen la división celular prematura al unirse a los factores de transcripción E2F para inhibir la transición G1. RB1 está regulada por fosforilación, de manera que, la proteína es completamente activa cuando se fosforila temprano en

la fase G1 del ciclo celular y cuando las células están inactivas en G0. Durante estas fases de reposo del ciclo celular, las señales de crecimiento promueven la expresión de ciclinas de tipo D, que forman complejos con CDK4 y CDK6 y se activan con ellos, lo que facilita la adición de grupos fosfato a RB1. Las ciclinas CDK4 y CDK6 se consideran funcionalmente equivalentes en su capacidad de fosforilar RB1. La dominancia de la quinasa depende del tipo de tejido, aunque, la inhibición de las dos quinasas es esencial terapéuticamente, ya que una podría compensar a la otra [135]. La fosforilación de RB1 por CDK4/6 inicia un proceso complejo de desactivación mediante fosforilación que finaliza con la liberación de E2F para impulsar la expresión de los genes necesarios para la entrada en la fase S y la progresión del ciclo celular[136]. La vía de señalización CDK4/6-RB1 tiene un papel central en la regulación del ciclo celular y frecuentemente se encuentra desregulado en procesos neoplásicos, fundamentalmente en algunos subtipos de cáncer de mama, donde se estima que hay una sobreexpresión de ciclina D1, hasta en el 50% de los casos. Este complejo es el mayor mediador de proliferación celular mediado por estrógenos, que inducen la expresión de la ciclina D1[137] y que por tanto promueven la actividad del



**Figura 36.** Papel de CDK4/6 en la regulación del ciclo celular. Modificado de Spring LM.

complejo CDK4/6 conduciendo a la fosforilación de RB1 y la promoción del ciclo celular[136] (Fig36)

El complejo ciclina D1-CDK4/6-RB1 es el mayor mediador de proliferación celular mediado por estrógenos. Los estrógenos inducen la expresión de la ciclina D1 y promueven la actividad CDK4/6 en los cánceres hormona receptor positivos (HR+), conduciendo a la hiperfosforilación de RB1 y la promoción del ciclo celular. El descenso de la señalización por estrógenos ha mostrado la reducción del complejo CDK-ciclina con el consiguiente arresto del ciclo celular en la fase G0 [136].

### **1.4.6.1. Desarrollo preclínico de inhibidores CDK4/6**

La patogénesis del cáncer de mama HR+ depende de la promoción de la ciclina D1 y la actividad de CDK4/6. Aunque es difícil atribuir con un experimento clave el éxito de los inhibidores CDK4/6 a nivel preclínico, hay varios experimentos con observaciones importantes. La ablación de la ciclina D1 y CDK4 en modelos con ratones previno el desarrollo de tumores mamarios[138,139]. Tras estos descubrimientos, múltiples estudios investigaron la sensibilidad de palbociclib in-vitro mostrando una alta inhibición selectiva y reversible de CDK4/6 en líneas celulares de tumores mamarios humanos[140]. Las líneas celulares HR+ de tipo luminal con función RB1 conservada, fueron las más sensibles. Los tumores triple negativo con pérdida de la función RB1 fueron los más resistentes a palbociclib[140]. En resumen, las líneas celulares con baja actividad de RB1 fueron las más resistentes al tratamiento. A raíz de estos ensayos preclínicos en los que también se observó un efecto sinérgico en la combinación palbociclib más tamoxifeno [140], se desarrollaron los estudios pivotaes con palbociclib “PALOMA-1” que concluyeron con la aprobación del primer anti CDK4/6 por las agencias reguladoras.

Actualmente, existen varios fármacos aprobados para el tratamiento del cáncer de mama avanzado HR+ y HER2 negativo, mediante la inhibición selectiva de CDK4/6. La especificidad de estos fármacos para inhibir CDK4/6 es esencial para su potencial

terapéutico sin toxicidad significativa, como muestra el ejemplo de dinaciclib, un potente inhibidor de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9, que no llegó a finalizar los estudios clínicos por elevada toxicidad[141]. La actividad de CDK4/6 no es esencial para la proliferación celular de muchos tipos celulares, probablemente por la compensación de CDK2 en respuesta a la inhibición de CDK4/6. Aunque existen diferencias en cuanto a la farmacocinética y toxicidad de los 3 fármacos. Las reacciones adversas cutáneas son similares con una frecuencia de entre el 10-18% de reacciones adversas de cualquier grado y del 1% de grados 3-4[136]

### 1.4.7. TAXANOS

Los taxanos como paclitaxel y docetaxel son activos frente a un gran número de cánceres humanos. Su actividad antitumoral está basada en la estabilización de la dinámica de los microtúbulos y la interrupción del ciclo celular. Paclitaxel fue identificado como la sustancia activa de un extracto de *Taxus brevifolia*. [142]. Paclitaxel fue el primer taxano clínicamente representativo como un nuevo tipo de droga antineoplásica. Es un agente antimicrotúbulo, pero, a diferencia de otros inhibidores de microtúbulos como los alcaloides de la vinca, que desestabilizan los microtúbulos, paclitaxel provoca la estabilización mediante su unión a la  $\beta$ -tubulina e inhibe la división del material genético. [143]. Los taxanos por tanto no son antineoplásicos selectivos ya que actúan en la fase de mitosis del ciclo celular y por tanto van a inhibir el crecimiento de todas las células que estén en división, tanto más, cuanto mayor sea la tasa de reproducción celular de la línea. Esto va a provocar numerosos efectos adversos, como mielosupresión, neuropatía o reacciones adversas cutáneas y alérgicas. Es relevante, la presentación comercial en la que se formula paclitaxel, ya que contiene Cremophor® que es un excipiente altamente alergogénico, responsable de casos de anafilaxia y reacciones alérgicas al paclitaxel comercial [144].

## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



### 2.1.HIPOTESIS

La hipótesis de este trabajo de investigación se basa en varias observaciones y antecedentes.

- La sensibilización cutánea es un proceso mecanísticamente definido y reproducible mediante técnicas in-vitro e in-chemicho
- Existe una relación entre la estructura química y la sensibilización cutánea y existen técnicas capaces de generar modelos predictivos [145]
- La OECD define las etapas claves de la sensibilización cutánea y propone las técnicas para identificar sensibilizantes cutáneos evitando la experimentación animal [146]
- Los principales compuestos sensibilizantes cutáneos son moléculas pequeñas que tienen carácter electrófilo o que mediante una reacción metabólica adquieren esa característica [146].
- Los antineoplásicos de terapia dirigida de tipo ITK del EGFR tienen un elevado porcentaje de reacciones adversas cutáneas.[147].
- Los anticuerpos frente al EGFR también tienen toxicidad cutánea a pesar de ser moléculas de gran tamaño [148]
- Los inhibidores de VEGFR tienen efecto tóxico cutáneo de grupo: el síndrome de reacción palmoplantar.

Por tanto, se establece la siguiente hipótesis:

**“Las técnicas propuestas por la OCDE que simulan los eventos claves de la hipersensibilidad retardada o sensibilización cutánea y que se han testado para sustancias químicas utilizadas por vía tópica, se postulan como potencialmente útiles en la predicción de la sensibilización cutánea provocada por fármacos antineoplásicos de terapia dirigida y administrados por vía sistémica.”**

## 2.2.OBJETIVOS

Con todos estos antecedentes los objetivos planteados en este proyecto de investigación son los siguientes:

- Analizar el potencial para identificar sensibilizantes cutáneos antineoplásicos por vía sistémica de las técnicas propuestas por la OCDE, que han sido testadas para compuestos químicos tópicos.
- Identificar dianas moleculares responsables de la toxicidad cutánea de los fármacos antineoplásicos de terapia dirigida.
- Establecer potenciales efectos de grupo a nivel cutáneo de los distintos fármacos antineoplásicos en función de su diana terapéutica.
- Estudiar la co-relación mecanística mediante métodos experimentales y métodos computacionales de análisis de relación estructura-actividad.



# 3. MATERIAL Y MÉTODOS



### 3.1. MATERIALES

#### 3.1.1. Reactivos control

Los reactivos control utilizados se seleccionaron de las guías de la OCDE de cada una de las técnicas utilizadas. Las soluciones peptídicas de stock se prepararon con una concentración final de 0,667 mM en tampón fosfato 100mM (pH de 7.5).

Compuesto	Laboratorio	Referencia
Ácido láctico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	W261114-1KG-K
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	I9516-25ML
Aldehído cinámico	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	W228613-100G-K
1-cloro-2,4-dinitrobenceno (DNCB)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	237329-10G
6-metilcumarina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	W269905-100G-K
Sulfato de níquel	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	N4882-1KG
Péptido de cisteína	Genosphere Biotechnologies (Paris, Francia).	Ac-RFAAKAA-COOH

**Tabla 22.** Reactivos control utilizados

#### 3.1.2. Antineoplásicos

Para validar las técnicas in vitro de predicción de hipersensibilidad retardada propuestas por la OCDE en fármacos de terapia dirigida oncológica, se seleccionó una batería de fármacos con distintas dianas terapéuticas. Entre los fármacos seleccionados se observan distintos perfiles de toxicidad cutánea. Los fármacos con mayor toxicidad cutánea que se incluyeron fueron inhibidores del EGFR, inhibidores del VEGFR, inhibidores del BCR-ABL. Los inhibidores del BCR-ABL se agruparon de esta manera por su principal indicación terapéutica, no obstante, se sabe que son inhibidores multikinasa, con distintos perfiles de inhibición, entre los que se encuentra

c-kit y PDGFR entre otros. Los fármacos con menos potencial tóxico a nivel cutáneo son inhibidores de ciclinas como palbociclib, inhibidores de PARP e inhibidores de mTOR

<b>Antineoplásico</b>	<b>Laboratorio</b>	<b>Referencia</b>
Sunitinib	Selleckchem	S7781
Bevacizumab	Selleckchem	A2006
Palbociclib	Selleckchem	S1116
Imatinib	Selleckchem	S2475
Olaparib	Selleckchem	S1060
Dasatinib	Selleckchem	S1021
Nilotinib	Selleckchem	S1033
Sorafenib	Selleckchem	S7397
Regorafenib	Selleckchem	S1178
Everolimus	Selleckchem	S1120
Cetuximab	Selleckchem	A2000
Olaparib	Selleckchem	S1060
Erlotinib	Selleckchem	S7786
Paclitaxel	MedChemExpress	HY-B0015

**Tabla 23.** Antineoplásicos utilizados.

Las concentraciones seleccionadas “a priori” para realizar los ensayos in-vitro fueron del orden de las concentraciones séricas descritas en la bibliografía. Excepto para el ensayo de DPRA, en cuyo protocolo de la OCDE describe las concentraciones estándar a utilizar al tratarse de un método in-chemico.

### 3.2. METODOS

El modelo de predicción para considerar un compuesto como sensibilizante fue el modelo 2 de 3 pruebas positivas basado en la OCDE, mediante el cual se consideraron sensibilizantes positivos los compuestos con 2 pruebas positivas de las 3 técnicas utilizadas (DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup> y h-CLAT).

El estudio SAR y el modelo de predicción basado en análogos químicos se realizó mediante la herramienta QSAR toolbox de la OCDE.

#### 3.2.1. Ensayo DPRA (Direct Peptide Reactivity Assay)

El ensayo DPRA se desarrolló según propone la OCDE [149]. Este ensayo pretende reflejar el primer paso de la vía que provoca las reacciones de hipersensibilidad retardada. Este primer paso consiste en una reacción nucleofílica entre los restos de cisteína y lisina de la piel y el agente sensibilizante que actúa como electrófilo. Este método cuantifica la depleción peptídica de un péptido que contiene restos de cisteína o lisina al estar en contacto con el compuesto en estudio. El modelo puede aplicarse utilizando ambos péptidos de lisina y cisteína o utilizando sólo uno de ellos. En este caso, se ha utilizado el modelo de cisteína por problemas de precipitación en el modelo de lisina. El porcentaje de depleción de cisteína se utiliza para categorizar la sustancia en estudio en 4 grupos de potencia sensibilizante creciente; no sensibilizante, sensibilizante débil, sensibilizante moderado y sensibilizante fuerte. La reacción con el péptido de cisteína se preparó en viales de cristal de auto inyección para HPLC. Cada vial se preparó con una concentración de 0.5 mM del péptido en combinación con diferentes concentraciones de cada sustancia a testar. Se prepararon controles con la misma concentración de 0.5mM del péptido de cisteína sin ningún compuesto adicional. Las rectas de calibración estándar se prepararon con solución de péptido a las concentraciones de 0.534, 0.267, 0.1335, 0.0667, 0.0334, 0.0167 mM en un tampón fosfato 100mM (pH 7.5) con acetonitrilo al 20%. Para la reacción de control

positivo se utilizaron DNCB y aldehído cinámico. Los controles negativos utilizados fueron la 6-metilcumarina y el ácido láctico. Los controles se prepararon en una solución del péptido a 0.5 mM con acetonitrilo como solvente. Los viales tapados se agitaron en vortex y se incubaron en oscuridad y temperatura ambiente (25°C) durante 24 horas. Tras la incubación el porcentaje de residuos de cisteína libres se cuantificaron en HPLC de fase reversa con detector UV. El sistema de cromatografía está compuesto por una columna Zorbax SB-C18 (2.1mm x 100 mm x 3.5 micron) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). El detector UV utilizado fue SPD-10AV VP UV-vis (SHIMADZU). El flujo utilizado fue 0.35 ml/min con gradiente de fase móvil A (0.1% vol/vol ácido trifluoroacético en agua) y fase móvil B (0.0.85% vol/vol ácido trifluoroacético en acetonitrilo) durante un periodo de 20 minutos. La concentración de péptido se determinó en cada reacción midiendo la absorbancia a 220 nm. La señal correspondiente a la elución de cisteína se integró para obtener el área del pico correspondiente a los residuos de cisteína libres tras la reacción con las sustancias a testar, los controles positivos y negativos y en las muestras control. Se calculó la recta de calibrado basado en las concentraciones de péptido estándar. La condición para aceptar la recta de calibrado fue obtener un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) > 0.990. La reactividad peptídica se reportó como el porcentaje de depleción peptídica que se calculó como la reducción de la concentración de péptido en las muestras con relación a la media de concentración de los controles, según la ecuación:

$$\% \text{ depleción peptídica} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{pico del área del péptido muestra}}{\text{pico medio del área del control}} \right) \right] \times 100$$

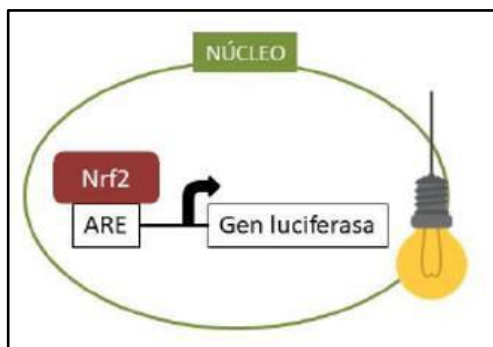
Las muestras se analizaron y clasificaron de acuerdo con el modelo de predicción de cisteína 1:10.

<b>% depleción de cisteína</b>	<b>Potencia</b>	<b>Predicción DPRA</b>
$0\% \leq \% \text{depleción Cys} \leq 13.89\%$	Mínimamente reactivo	Negativo
$13.89\% < \% \text{depleción Cys} \leq 23.09\%$	Poco reactivo	Positivo
$23.09\% < \% \text{depleción Cys} \leq 98.24\%$	Moderadamente reactivo	
$98.4\% < \% \text{depleción Cys} \leq 100\%$	Altamente reactivo	

**Tabla 24.** Modelo predictivo de cisteína en DPRA.

### 3.2.2. KERATINOSENS™

El ensayo KeratinoSens™ se fundamenta en el segundo evento clave del mecanismo de sensibilización cutánea, basado en la activación del queratinocito inducida por háptenos y que es mediada por genes de respuesta antioxidante. KeratinoSens™ utiliza una línea celular de queratinocitos transfectados con el gen de la luciferasa unido a una secuencia reguladora de la respuesta antioxidante (ARE/Antioxidant Response Element) que es regulada por Nrf2 (Nuclear factor-erythroid related factor 2). Nrf2 en condiciones basales se encuentra unido a la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein1). Las moléculas con grupos electrófilos pueden provocar modificaciones covalentes en los residuos de sulfhidrilo que resultan en la disociación de Nrf2. La disociación de Nrf2 puede activar genes ARE. En el ensayo KeratinoSens™ la secuencia de genes ARE están transfectados con el gen de la luciferasa y nos permite medir la expresión de los genes ARE mediante luminiscencia.



**Figura 37. Inducción de la expresión de la luciferasa en la línea celular keratinoSens®.** Figura creada con Biorender.

La línea celular KeratinoSens™ se obtuvo de Givaudan (Vernier, Suiza). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con glucosa, Glutamax™, suero fetal bovino (FCS) al 9.1% (Amimed) Y genética™ (500 µg/mL) a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Al alcanzar una confluencia del 80-90% las células se sembraron en placas opacas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo) para el ensayo de la luciferasa. Paralelamente se sembraron las células en placas transparentes de 96 pocillos para el ensayo MTT. Las placas se incubaron durante 24 horas, tras las cuales se reemplazó el medio por medio sin antibiótico con FCS al 1%. Las sustancias a testar se disolvieron en DMSO y se diluyeron en medio sin antibióticos con FCS al 1% antes de añadirlo al cultivo celular. Los controles utilizados en el ensayo fueron DNCB (3,9 µM) y aldehído cinámico (32 µM) como controles positivos y ácido láctico (1000 µM) e isopropanol (1000 µM) como controles negativos. El solvente utilizado para los controles también fue DMSO. Las células se incubaron con las sustancias problema durante 48 horas bajo las mismas condiciones. Tras el período de incubación, se lavaron los pocillos con DPBS y se incubaron con tampón de lisis durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la lisis celular se añadió el reactivo de luciferasa (Promega) y se midió inmediatamente la luminiscencia en el luminómetro (Lumistar Omega, BMG Labtech). El incremento de luminiscencia se calculó utilizando como comparador un pocillo control de células incubadas sin



ninguna sustancia sensibilizante. La potencia en la inducción de la luciferasa se calculó mediante el EC1.5 que indica la concentración de la sustancia problema que induce el incremento en 1.5 veces con respecto a la expresión basal de luciferasa. El EC1.5 se calculó según la siguiente ecuación:

$$EC1.5 = (Cb - Ca) \times \frac{1.5 - Ia}{Ib - Ia} + Ca$$

, donde Ca es la concentración menor que provoca un incremento de 1.5; Cb es la mayor concentración que no induce un incremento de 1.5; Ia es la inducción medida a la concentración más baja que provoca un incremento superior a 1.5; Ib es la inducción medida a la concentración más alta que provoca un incremento inferior a 1.5.

Los criterios de validez para cada experimento fueron:

- El valor de EC1.5 del aldehído cinámico debe estar entre 7 y 30  $\mu$ M
- El coeficiente de variación de luminiscencia para el control debe ser menos del 20%

Los criterios para considerar un compuesto positivo en el ensayo KeratinoSens fueron:

- La Imáx debe ser igual o mayor de 1.5 y estadísticamente significativo en comparación con el control negativo. El test estadístico utilizado para cada experimento fue la prueba t-student para muestras relacionadas.
- La viabilidad celular debe ser mayor del 70% para la concentración más baja del compuesto que induce una Imáx  $\geq$  1.5.

### **3.3.3. Ensayo MTT en queratinocitos en monocapa**

Para determinar la viabilidad celular de queratinocitos se utilizó el ensayo MTT bajo las mismas condiciones experimentales utilizadas en KeratinoSens<sup>TM</sup>. El medio se

eliminó de las placas y se incubó con una solución de MTT (0.6 mg/mL) en medio fresco 1% FCS durante 4 horas a 37°C. Se eliminó el medio y se añadió DMSO a cada pocillo para disolver el azul de formazán producido por las células. La lectura se realizó mediante espectrofotometría a 600 nm (Infinite M200, Tecan).

Para el cálculo de la viabilidad se siguió la siguiente fórmula:

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

Dónde,  $V_{muestra}$  es la absorbancia medida del MTT del compuesto testado,  $V_{blanco}$  es la absorbancia del MTT del blanco (compuesto sin células ni compuesto testado);  $V_{solvente}$  corresponde a la absorbancia del control negativo (células con medio de cultivo)

### 3.3.4. Ensayo h-CLAT (Human cell line activation test)

El ensayo h-CLAT cuantifica los cambios en la expresión de marcadores de la superficie celular asociados al proceso de activación de monocitos y células dendríticas, en concreto CD86 y CD54. Debido a la complejidad para aislar células dendríticas, en este ensayo se utilizan líneas celulares de monocitos THP-1 y U-937. Este cambio está basado en la respuesta similar que tienen monocitos y células dendríticas al entrar en contacto con alérgenos, ya que ambos expresan como respuesta CD86 y CD54 en su superficie celular. Por tanto, la expresión de estos dos marcadores es la diana que vamos a utilizar para discriminar entre sensibilizantes y no sensibilizantes[150].

El ensayo hCLAT se realizó en células THP-1 (obtenidas de ATCC, Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 10% (GE Healthcare Life Science), 100/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomicina (Lonza,

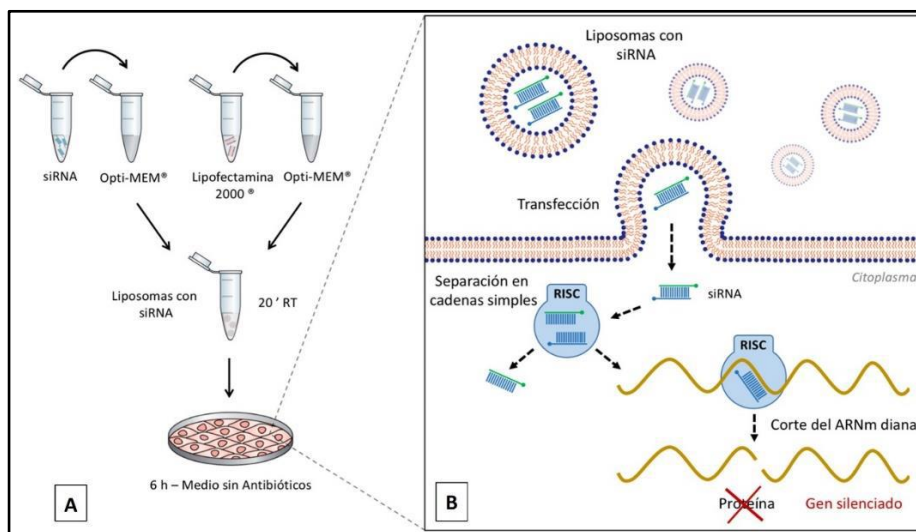
DE 17-602E). Las sustancias por testar se disolvieron con DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de ensayo no excedió del 0.2%. Para el test de activación las células THP-1 se incubaron en placas de 24 pocillos con una confluencia de  $1 \times 10^6$  células por pocillo durante 24 horas, con varias concentraciones de las sustancias a testar. Isopropanol (1000  $\mu\text{M}$ ) y ácido láctico (1000  $\mu\text{M}$ ) se utilizaron como controles negativos y DNCB (10  $\mu\text{M}$ ) y el sulfato de níquel (900  $\mu\text{M}$ ) como controles positivos. Tras la exposición con las sustancias problema las células se lavaron con FCS (Introgen, 00-4222-26). Después se resuspendieron y se lavaron con tampón de bloqueo que contiene globulinas fracción II/III Cohn (G2388-10G, Sigma-Aldrich). Las células se incubaron durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con los siguientes anticuerpos monoclonales: APC mouse IgG1 (Dako, X0927), FITC mouse anti-human CD54 (Dako, FT7143) y FITC mouse anti-human CD85 (Dako, F7205). Las células se lavaron y se trataron con yoduro de propidio (Sigma Aldrich, P4170-100mg) y se midió la intensidad de fluorescencia de las células viables utilizando el analizador BDLSR Fortessa X-20. Se calculó la intensidad relativa de fluorescencia (RFIs) de CD86 y CD54, mediante la fórmula:

$$RFI = \frac{MFI (cels\ tratadas) - MFI (control\ isotipo\ de\ las\ cels\ tratadas)}{MFI (cels\ control) - MFI (control\ isotipo\ de\ las\ cels\ control)} \times 100$$

Se clasificó como prueba positiva si la RFI de CD86 o CD54 fue mayor del 150 o 200% respectivamente a cualquier dosis en dos experimentos. Para considerar el test valido, la viabilidad celular de los controles debía ser mayor del 90% y la viabilidad celular de los pocillos incubados con las sustancias problema debía ser mayor del 50%.

### 3.3.5. Silenciamiento de VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3

Para evaluar la implicación de los subtipos del receptor de VEGFR en el potencial sensibilizante derivado de la inhibición de esta vía de señalización se realizó la transfección de las células (keratinocitos y THP-1 para KeratinoSens y hClat respectivamente) con siRNA 50nM en suero sin antibiótico. Los siRNA se compraron a Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK, catalog no. 4390843). FLT1 (VEGFR1) (identificación no. ID192, catalog no. AM16708), KDR (VEGFR2) (identificación no. ID145034, catalog no AM16708) y FLT4 (VEGFR3) (identificación no. ID145459, catalog no 1M16708). El reactivo de transfección utilizado fue lipofectamina-2000 (Invitrogen, Paisley, UK; catalog no.11668-027) con una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig38). El RNA total se aisló usando TriPure® Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). La integridad del RNA extraído se confirmó con el bioanalizador (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Se realizó la transcripción reversa en 300 ng de RNA total con el kit de reactivos de transcripción reversa TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, USA). El cDNA se amplificó con primers y sondas específicas prediseñadas por Applied Biosystems for FLT1 (ID 192), KDR (ID 145034) y FLT4 (ID 145459) en el sistema PCR en tiempo real 7900HT (Applied Biosystems) usando el Universal Master Mix (Applied Biosystems). El valor medio de las réplicas para cada muestra se calculó como el cycle threshold (Ct). El nivel de expresión génica se calculó como la diferencia de Ct ( $\Delta\text{Ct}$ ) entre el valor Ct del gen diana y el valor Ct basal.



**Figura 38. Silenciamiento génico mediante ARN interferente.** (A) Protocolo para generar liposomas con siARN mediante Lipofectamina 2000®. (B) Mecanismo molecular de silenciamiento mediante siARN. Figura creada con biorender

### 3.3.6. Análisis SAR y predicción QSAR

Se realizó un análisis de relación estructura actividad con la herramienta QSAR toolbox de la OECD. Este software permite el análisis del riesgo potencial toxicológico mediante un flujo de trabajo que hay que definir para identificar grupos químicos presentes en nuestra molécula en estudio, con potencial de provocar un determinado efecto toxicológico. En nuestro caso el objeto de estudio es la sensibilización cutánea. En función de los grupos que se identifican se categoriza la molécula y se buscan análogos, seleccionando las bases de datos que nos interesan. El siguiente paso es chequear si la molécula objetivo nos reporta datos del “endpoint” definido. En caso de no encontrar datos, consideramos un nicho experimental y por tanto procedemos a realizar una predicción en función de los análogos reportados por la herramienta con resultados experimentales para el “endpoint” definido. Finalmente,

la aplicación realiza una predicción en función de los resultados experimentales de los análogos con mayor relación estructural con la molécula objetivo. Por lo tanto, los objetivos del análisis con la herramienta QSAR toolbox son:

- Establecer una explicación mecanística basada en la estructura química de la molécula.
- Comprobar la existencia de resultados experimentales para el “endpoint” definido de la molécula objetivo.
- En caso de establecer un nicho experimental, realizar una predicción basada en la extrapolación de datos experimentales de análogos químicos.

El flujo de trabajo de los diferentes módulos que contiene la aplicación fue el siguiente:

1. Input: El objetivo de este módulo es introducir la molécula objetivo en el flujo de trabajo. Para ello se utilizó el nombre de la molécula, el número CAS o el “canonical SMILES” (The Simplified Molecular-Input Line-Entry System).
2. Profiling: En este módulo se seleccionan los modelos o perfiladores en los que queremos basar nuestro análisis para establecer la categoría de nuestra molécula. Para nuestro modelo de sensibilización se seleccionaron 5 perfiladores:
  - Keratinocyte gene expresión
  - Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS
  - Protein binding potency Cys (DPRA 13%)
  - Protein binding potency Lys (DPRA 13%)

○ Protein binding potency h-CLAT

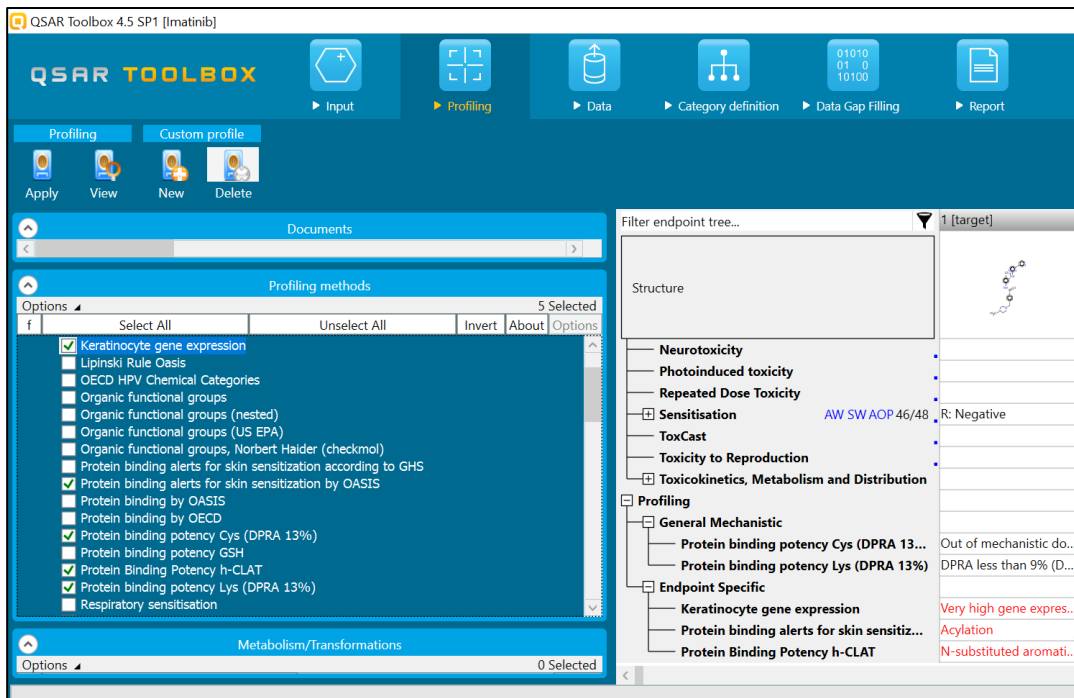
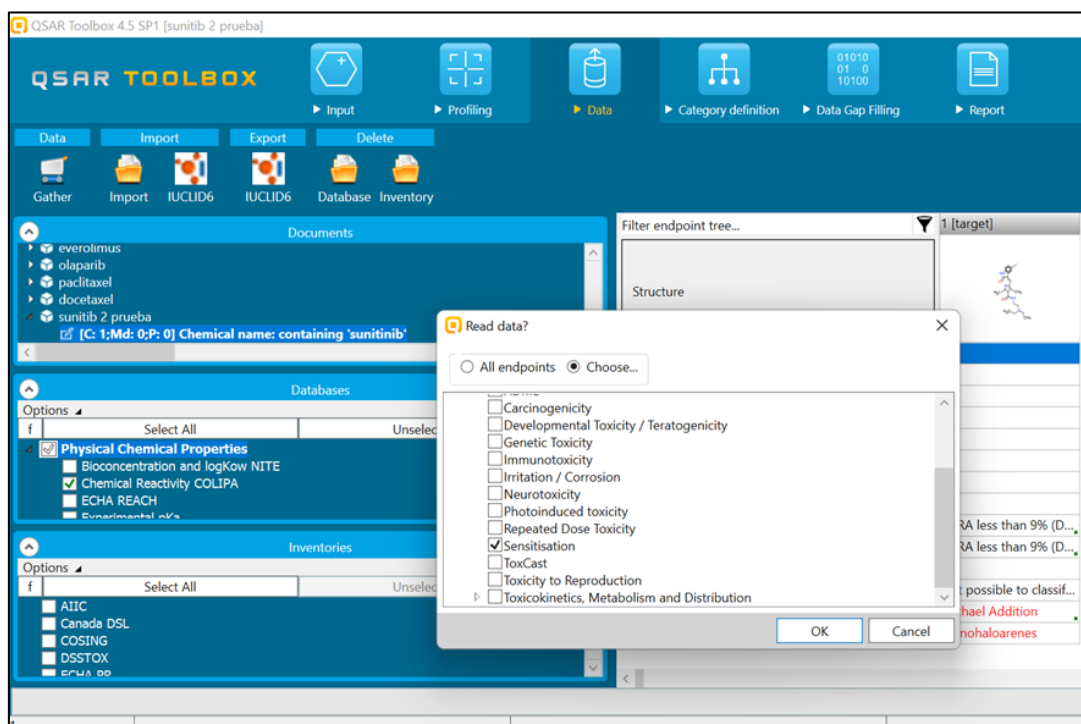


Figura 39. Módulo “profiling” de QSAR toolbox. Se muestran los perfiladores seleccionados para la identificación de motivos estructurales dentro de la molécula objetivo

3. Data: En este módulo se seleccionan las bases de datos para buscar información experimental de la molécula objetivo respecto al endpoint definido. El endpoint seleccionado es “sensitization”. En este punto obtendremos los resultados experimentales en las bases de datos de la aplicación. Las opciones aquí serán obtener datos reportados de nuestra molécula o encontrar un nicho experimental en caso de no obtener ningún dato reportado.

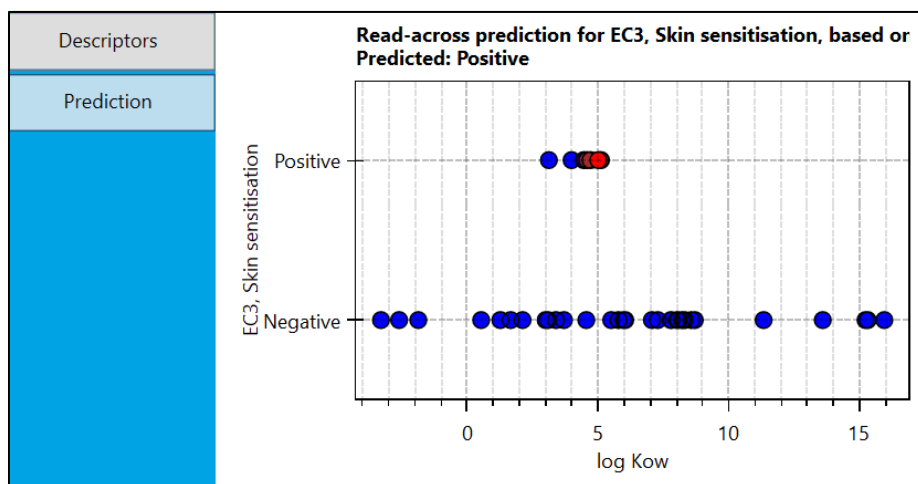


**Figura 40.** Módulo “data” de QSAR toolbox. Se muestra la interfaz de la aplicación dónde se selecciona el “endpoint” para la selección de las bases de datos a utilizar.

4. **Category definition:** En este módulo seleccionamos la categoría en la cual queremos agrupar nuestro fármaco. Para ello nos basamos en los resultados obtenidos en el módulo “profiling”. En nuestro flujo de trabajo se da prioridad a la categoría “proteing binding alerts for skin sensitization by OASIS”. Si en el módulo “profiling” no obtenemos resultados coincidentes para ninguna categoría no podemos continuar con la predicción por extrapolación de datos de compuestos químicos análogos y el resultado será indeterminado.



5. Data gap filling: En este módulo se realiza la predicción de la molécula objetivo para el “endpoint” definido. En nuestro flujo de trabajo la predicción se realizó por extrapolación mediante la opción “read across” que establece un valor al endpoint de la molécula objetivo en función de los resultados reportados por los 5 análogos estructurales más cercanos a la molécula problema.



**Figura 41. Ejemplo del resultado de la predicción por análogos de QSAR toolbox.** En rojo se muestra el resultado de la predicción de la molécula objetivo. En marron aparecen los análogos utilizados para la predicción. En azul el resto de análogos de la categoría no utilizados para la predicción



## 4. RESULTADOS



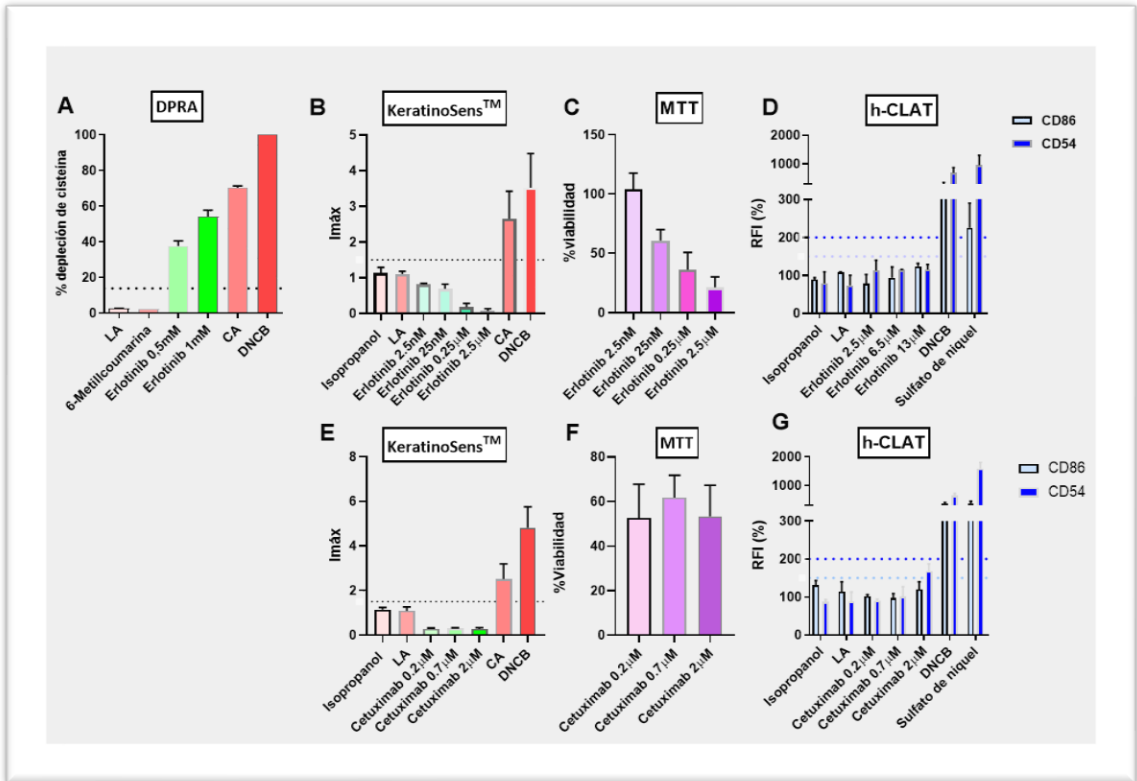
### **4.1. Resultados de las técnicas de sensibilización cutánea**

El análisis de los resultados se muestra agrupados por familia terapéutica, teniendo en cuenta la diana principal que les confiere a cada grupo de fármacos su indicación principal.

#### **4.1.1. La inhibición de EGFR no tiene potencial sensibilizante**

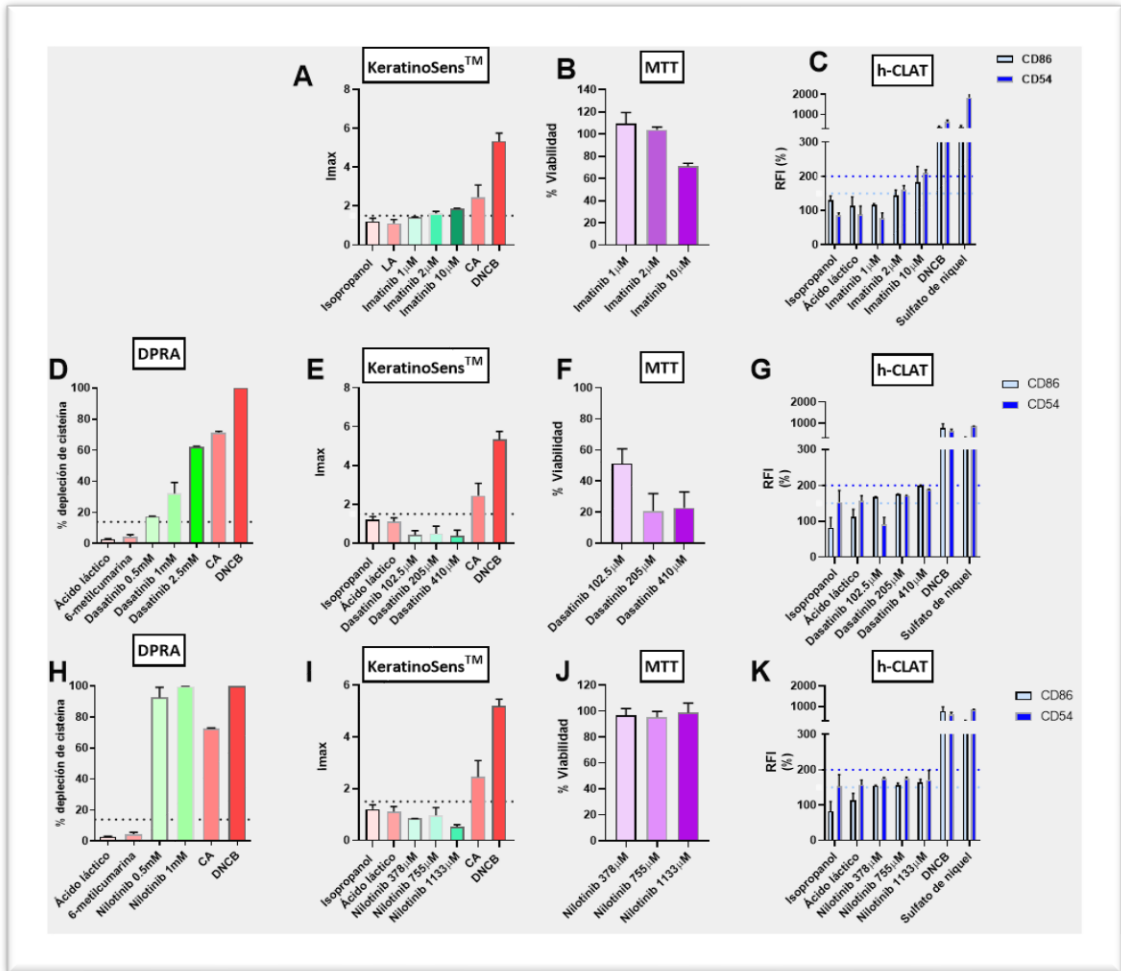
Los fármacos inhibidores de EGFR testados, erlotinib y cetuximab, no mostraron ser sensibilizantes según las técnicas testadas. Erlotinib fue positivo en la prueba DPRA lo que indica que tiene potencial electrófilo. Sin embargo, para h-CLAT y Keratinosens no mostró potencial sensibilizante. En el test de keratinosens se reveló la relación indirecta entre concentración y luminiscencia, lo cual se explica por el potencial citotóxico directo de erlotinib sobre los keratinocitos, como se muestra en el ensayo MTT, dónde la viabilidad celular fue del 21% con la concentración máxima testada. Por este motivo las concentraciones testadas de erlotinib en keratinosens son inferiores a las concentraciones plasmáticas terapéuticas, que resultaban ser demasiados tóxicas para los keratinocitos y por tanto reducen la validez de la técnica. Esto no excluye que el mecanismo de sensibilización pueda tener un papel en la toxicidad cutánea de erlotinib, a la que además se suma el efecto citotóxico directo sobre los keratinocitos. Cetuximab sólo se testó en keratinosens y h-Clat por su elevado tamaño molecular y las limitaciones técnicas de la cromatografía para estos compuestos. Los resultados fueron negativos para ambas técnicas con una viabilidad variable que no mostró relación con la concentración. La especificidad de cetuximab por el EGFR y la discordancia entre los resultados de las dos moléculas son

indicativos de que la vía EGFR no es potencialmente sensibilizante y por tanto debemos pensar en otros mecanismos causales como la citotoxicidad directa.



#### 4.1.2. Los inhibidores del BCR-ABL tienen potencial sensibilizante

Los inhibidores del BCR-ABL son fármacos inhibidores multikinasa que tienen indicación en LMC. Imatinib encabeza este grupo de fármacos y mostró ser positivo para las pruebas de h-Clat y keratinosens, con una viabilidad del 100% para las dos concentraciones más bajas testadas y del 70% cuando se incrementa su concentración hasta 10  $\mu\text{M}$ . En el ensayo DPRA no se pudieron obtener resultados debido a coelución de imatinib con el péptido de cisteína y no se pueden obtener conclusiones del ensayo. No obstante, el compuesto se consideró positivo según la regla 2/3. Dasatinib y nilotinib son dos inhibidores BCR-ABL de segunda generación, siendo ambos positivos en los test h-Clat y DPRA. En h-Clat, ambos fueron positivos por la inducción de CD86 y no mostraron reactividad para CD54. Ninguno de los dos compuestos fue positivo para el ensayo keratinosens, aunque se observaron diferencias en el potencial citotóxico sobre los keratinocitos, donde nilotinib a las concentraciones testadas mostró una viabilidad del 100%, mientras que en el caso de dasatinib se observó una viabilidad del 60% a la concentración más baja testada de 102.5  $\mu\text{M}$  y cierta tendencia dosis-respuesta. Con estos resultados podemos clasificar los 3 compuestos como potenciales sensibilizantes cutáneos, aunque debido a las múltiples y diferentes kinasas que inhiben los 3 fármacos resulta complicado asociar a específicamente la inhibición de esta vía como potencialmente sensibilizante. Además, teniendo en cuenta que es una proteína procedente de un oncogén mutado y que es el responsable de la desregulación del ciclo celular que provoca la enfermedad es poco probable que la inhibición de esta proteína justifique la sensibilización cutánea que muestran nuestros resultados.



**Figura 43. Análisis de hipersensibilidad retardada de inhibidores BCR-ABL; imatinib, dasatinib y nilotinib mediante DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT.** (A) Resultados en KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con imatinib, mostrados como actividad de luciferasa (Imax) (n=2). (B) Viabilidad de queratinocitos tras 48 horas de incubación con imatinib (n=2). (C) Análisis h-CLAT tras 48 horas de incubación con imatinib. Los resultados se muestran como la intensidad de fluorescencia relativa (%RTI) de CD86 y CD54 (n=2) (D) Análisis DPRA tras 24 horas de incubación con dasatinib. Los resultados se muestran como el porcentaje de depleción de cisteína (n=2) (E) Resultados de KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con dasatinib (n=2). (F) Viabilidad celular de queratinocitos tras 48 horas de incubación con dasatinib (n=2) (G) Resultados de expresión de CD86 y CD54 en h-CLAT tras 48 horas de incubación con dasatinib, mostrados como %RFI (n=2) (H) Análisis DPRA tras 24 horas de incubación con nilotinib. Los resultados se expresan como % de depleción de cisteína (n=2) (I) Resultados tras 48 horas de incubación con nilotinib en KeratinoSens™

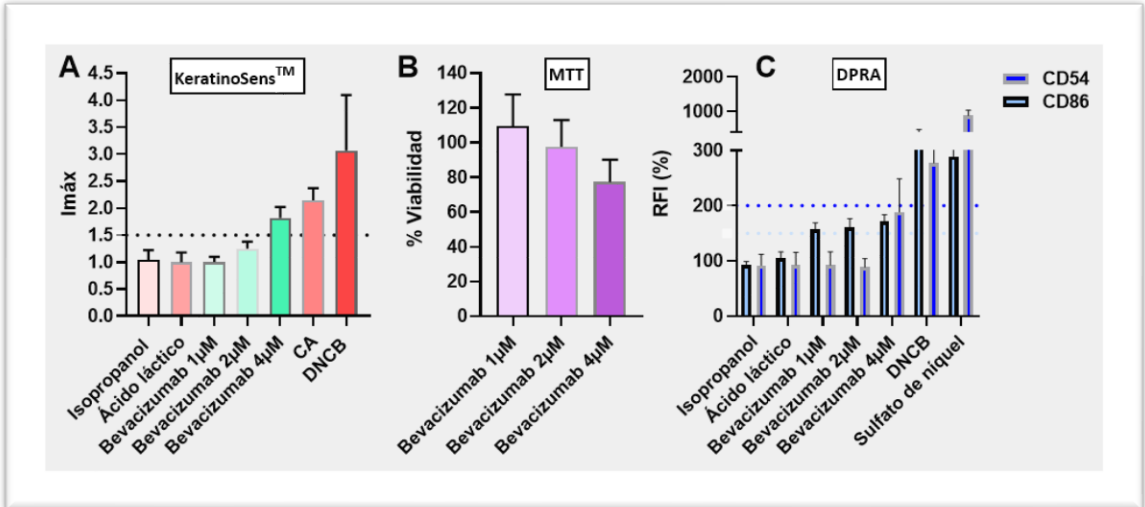


expresados como actividad de luciferasa (Imáx) (n=2) (J) Viabilidad celular mediante ensayo MTT tras 48 horas de incubación con nilotinib (n=3) (K) Análisis h-CLAT tras 48 horas de incubación con nilotinib. Los resultados se expresan como %RFI de CD86 y CD54. Como controles negativos se utilizó ácido láctico, isopropanol y 6-metilcumarina. Como controles positivos se utilizó DNCB y sulfato de níquel. Los resultados se muestran como media  $\pm$  DE (n=2). La línea punteada marca el umbral mínimo de positividad.

### **4.1.3. Los inhibidores VEGFR tienen potencial efecto sensibilizante de grupo**

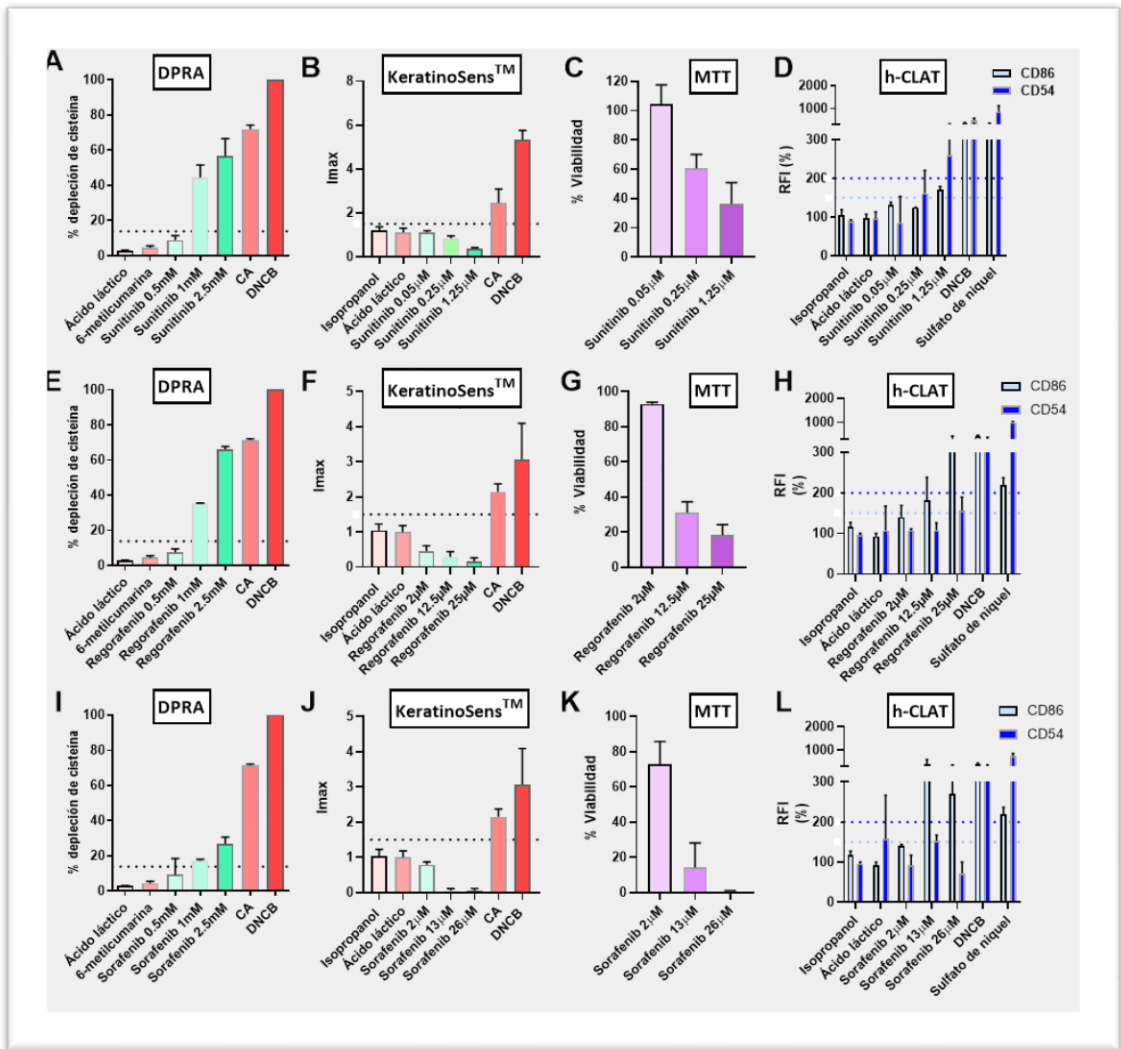
Para evaluar la vía anti-VEGFR se testaron inhibidores tirosin kinasa de varias generaciones como sunitinib, sorafenib y regorafenib. Sunitinib como representante de la primera generación de fármacos anti-VEGFR mostró depleción de cisteína moderada a las 2 concentraciones más altas testadas en el ensayo DPRA. En el ensayo de keratinoSens no se alcanzó el umbral de luminiscencia para considerar el compuesto positivo, de hecho, se observa una correlación negativa de luminiscencia con respecto a la concentración, lo cual se puede explicar por el efecto citotóxico dosis dependiente sobre los queratinocitos que se observó en el ensayo de viabilidad. En h-CLAT sunitinib fue positivo a la concentración más alta testada (1,25  $\mu$ M) por inducir la expresión de CD54 y CD86. Los ITKs de segunda generación testados, sorafenib y regorafenib, mostraron resultados similares. En el ensayo DPRA ambos mostraron una depleción de cisteína moderada y dosis dependiente. Esta similitud en la reactividad con la cisteína puede explicarse por la similitud química entre ambos compuestos que solo difieren en un átomo de flúor. En keratinoSens los resultados fueron negativos para ambos compuestos, pero al igual que sunitinib mostraron un efecto citotóxico dosis dependiente. Por último, en el ensayo h-CLAT ambos compuestos fueron positivos a las concentraciones testadas. Estos resultados son indicio de un potencial efecto de grupo y según las técnicas utilizadas se pueden considerar como sensibilizantes cutáneos. Los compuestos ITK aunque son moléculas dirigidas no son específicas del receptor VEGF y pueden inhibir otras receptores

tirosin kinasa. Sin embargo, bevacizumab es un anticuerpo monoclonal específico del VEGFR. Por su alto peso molecular no se pudo testar en el ensayo DPRA. Los resultados en keratinoSens fueron positivos para la concentración más alta testada



**Figura 44. Análisis de hipersensibilidad retardada de bevacizumab mediante KeratinoSens™ y h-CLAT.** (A) Análisis en KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con bevacizumab. Resultados expresados como actividad de luciferasa (Imax) (n=2). (B) Viabilidad celular tras 48 horas de incubación con bevacizumab (n=2) (C) Expresión de CD86 y CD54 expresado como intensidad relativa de fluorescencia (%RFI) en h-CLAT tras 48 horas de incubación con bevacizumab. Los controles negativos utilizados fueron ácido láctico e isopropanol. Como control positivo se utilizó DNCB, cinamaldehído (CA) y sulfato de níquel. Se muestran los resultados como media ± DE (n=3). La línea punteada muestra el límite mínimo de positividad.

(4µM) ya que, a diferencia de los TKIs, bevacizumab mostró buena viabilidad celular en el ensayo de citotoxicidad, siendo la viabilidad superior al 70% a la concentración más alta testada. En el ensayo h-CLAT también se superó el umbral marcado de inducción de la expresión de CD86 por lo que también se consideró positivo en esta técnica y por tanto también se clasifica como sensibilizante cutáneo según las técnicas propuestas. De esta manera, todos los compuestos anti-VEGFR testados mostraron potencial sensibilizante, siendo indicativo de un potencial efecto de grupo.



**Figura 45. Análisis de hipersensibilidad retardada de inhibidores de VEGFR; sunitinib, regorafenib y sorafenib mediante las técnicas DPRA, KeratinoSens™ y h-CLAT.** (A) Análisis DPRA tras 24 horas de incubación con sunitinib. Los resultados se expresan como porcentaje de depleción de cisteína. (B) Resultados de KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con sunitinib. Los resultados se muestran como inducción de luciferasa (Imáx). (C) Viabilidad celular tras 48 horas de incubación con sunitinib (D) Análisis h-CLAT tras 48 horas de incubación con sunitinib. Los resultados se muestran como la intensidad de fluorescencia relativa (%RFI). (E) Análisis DPRA tras 24 horas de incubación con regorafenib. Resultados expresados como % de depleción de cisteína. (F) Resultados en KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con regorafenib expresados como actividad de luciferasa (Imáx). (G) % Viabilidad celular tras 48 horas de incubación con regorafenib en ensayo MTT. (H) Análisis h-CLAT tras 48 horas de incubación con regorafenib. Resultados mostrados como %RFI. (I) Análisis DPRA tras 24 horas de incubación con sorafenib. Resultados se expresan como %

de depleción de cisteína. (J) Resultados de KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con sorafenib. Se expresan los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (K) Viabilidad celular tras 48 horas de incubación con sorafenib. (L) Resultados h-CLAT expresados como inducción de CD86 y CD54 expresados como %RFI, tras incubación con 48 horas con sorafenib. Los controles negativos utilizados fueron ácido láctico, isopropanol y 6-metilcumarina. Como controles positivos se utilizó DNCB, cinamaldeído (CA) y sulfato de níquel. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE (n=3). La línea punteada indica el límite mínimo de positividad.

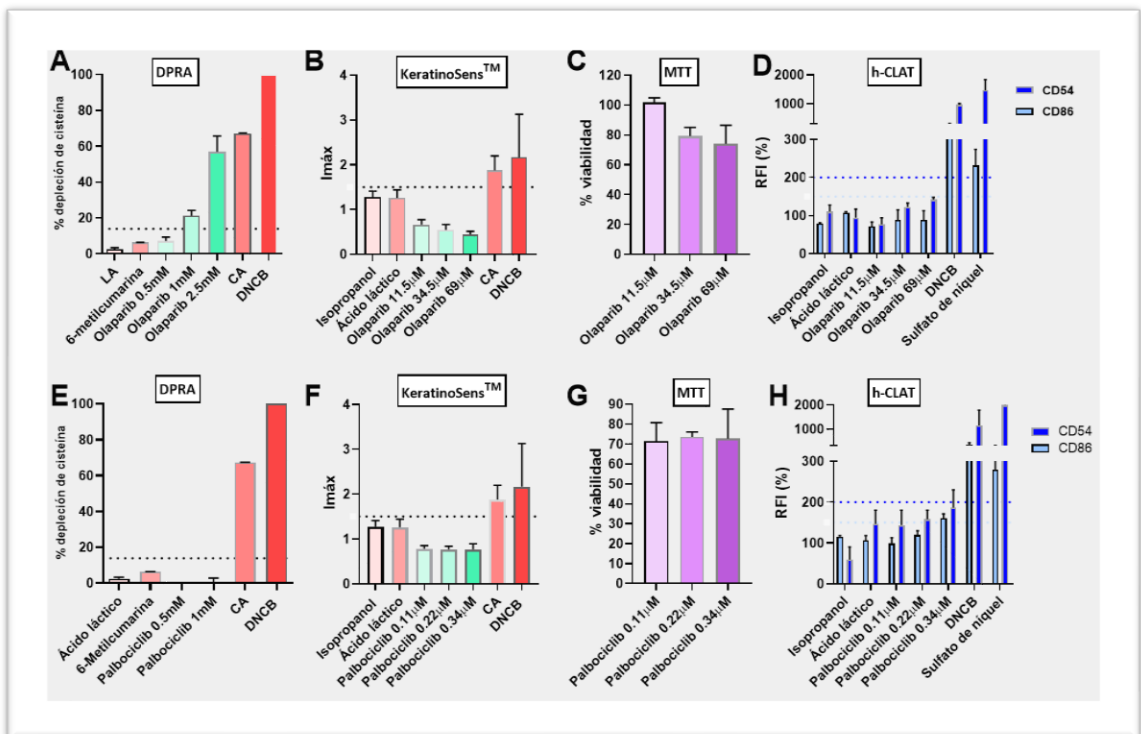
#### **4.1.4. Los inhibidores PARP no mostraron potencial de sensibilización cutánea**

Como representante de los inhibidores PARP se testó al cabeza de familia olaparib. En el ensayo keratinosens olaparib mostró escasa reactividad, siendo el valor de Imáx incluso menor que los controles negativos. Además, se confirma su bajo potencial de estimulación de Nrf2 ya que no la viabilidad de keratinocitos en el ensayo MTT fue superior al 70% con las tres concentraciones testadas, incluso del 100% en el caso de la concentración más baja. Olaparib tampoco resultó positivo en cuanto a la estimulación de CD54 y CD86 según el rango establecido a las concentraciones testadas. En el ensayo DPRA Olaparib mostró una reactividad baja a 1 mM y moderada a la concentración 2.5 mM, con unos porcentajes de depleción de cisteína del 21.21% y 56.89% respectivamente, por lo que en este ensayo se consideró positivo. Con estos resultados y según la regla “2 de 3” olaparib se consideró como un compuesto no sensibilizante.

#### **4.1.5. Los inhibidores de ciclinas CDK4/6 no tienen potencial de sensibilización dérmica ni toxicidad en queratinocitos**

El representante utilizado en el cribado de este grupo farmacológico fue palbociclib que mostró escasa reactividad en las tres técnicas utilizadas. En KeratinoSens el resultado de Imáx fue inferior a 1.5 en todas las concentraciones testadas siendo un experimento válido por el alto porcentaje de viabilidad en el ensayo de MTT (superior al 70% en todas las concentraciones testadas). En el ensayo h-CLAT tampoco se

alcanzaron los niveles de expresión marcados para la positividad con las concentraciones testadas, aunque se observó un ligero efecto dosis-respuesta tanto para la expresión de CD54 como CD86. En DPRA el porcentaje de depleción de cisteína fue inferior al 13.89% y por tanto se consideró negativo también para esta técnica. Con estos resultados se descarta el potencial sensibilizante de palbociclib como representante de la familia de inhibidores CDK4/6.



**Figura 46. Análisis de hipersensibilidad retardada de olaparib y palbociclib.** (A) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con olaparib. Los resultados se muestran como % de depleción de cisteína. (B) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con olaparib. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (C) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas de incubación con olaparib. (D) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con olaparib. Se muestran los resultados como expresión de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (% RFI). (E) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con palbociclib. Los resultados se muestran como % de depleción de cisteína. (F) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con palbociclib. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (G) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas

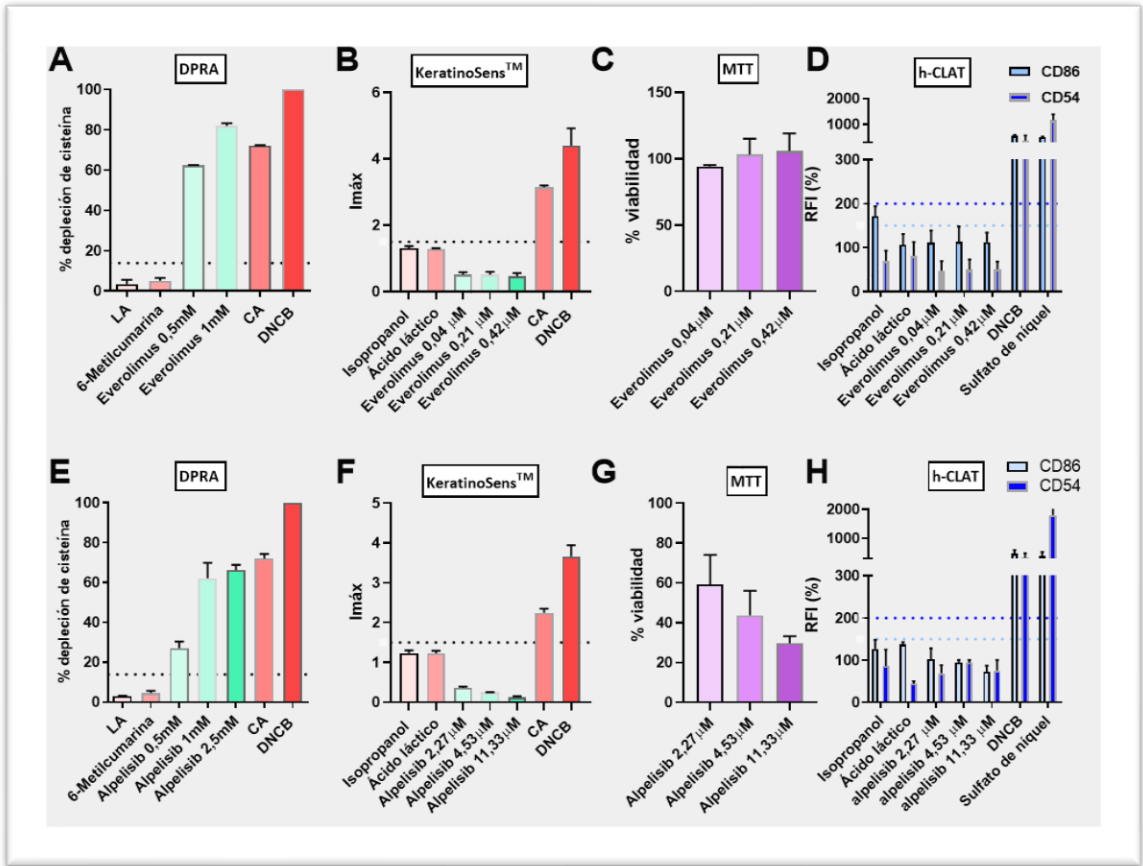
de incubación con palbociclib. (H) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con palbociclib. Se muestran los resultados como expresión de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (%RFI). Los controles negativos utilizados fueron ácido láctico, isopropanol y 6-metilcumarina. Como controles positivos se utilizó DNCB, cinamaldeído (CA) y sulfato de níquel. Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE (n=3). La línea punteada indica el límite mínimo de positividad.

### **4.1.6. Los inhibidores de PIK3 reportan resultados negativos para sensibilización cutánea pero con potencial citotóxico directo.**

Alpelisib es un inhibidor de la vía PIK3/AKT mediante su unión a la subunidad alfa de la PIK3. Es interesante el estudio del potencial sensibilizante por la alta frecuencia de reacciones adversas cutáneas que provoca. En el ensayo de DPRA mostró una depleción de cisteína 66.17% a 2.5 $\mu$ M. En el ensayo de keratinosens los resultados no fueron concluyentes por el efecto citotóxico sobre los queratinocitos y que reportaron resultados negativos en el ensayo de luminiscencia. En el ensayo de h-CLAT no se alcanzó la expresión suficiente de CD54 y CD86 y tampoco se observó un efecto dosis-respuesta. Con estos resultados alpelisib se clasificó como un compuesto no sensibilizante según nuestras técnicas, aunque con potencial citotóxico para los queratinocitos.

### **4.1.7. Los inhibidores mTOR no son sensibilizantes cutáneos**

Los inhibidores de mTOR son análogos de la rapamicina con propiedades inmunosupresoras y antiproliferativas. Debido al enfoque de nuestros ensayos en fármacos antineoplásicos, se seleccionó everolimus por tener una presentación autorizada para el tratamiento del cáncer de mama. Los resultados mostrados tanto en keratinosens como en h-CLAT fueron negativos, mostrando escasa toxicidad sobre los queratinocitos. En el ensayo de DPRA el porcentaje de depleción de cisteína fue del 83.21% a la concentración 1 $\mu$ M por lo que se consideró positivo para esta técnica.

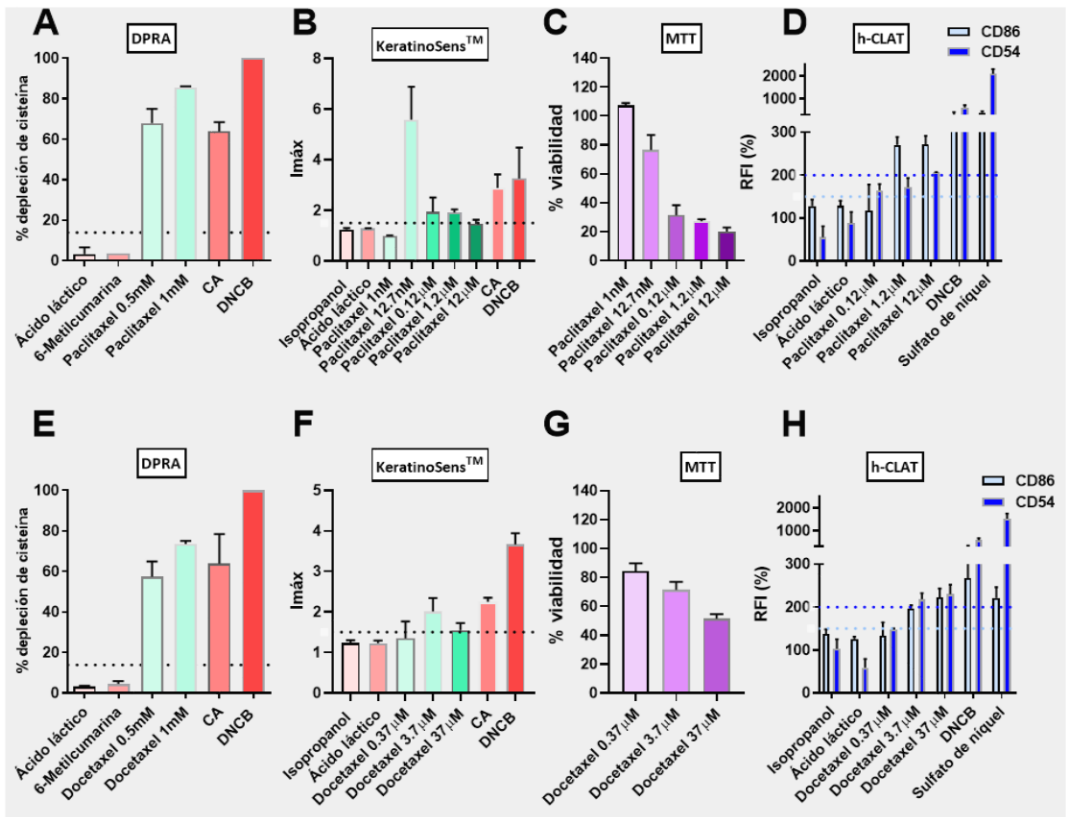


**Figura 47. Análisis de hipersensibilidad retardada de everolimus y alpelisib.** (A) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con everolimus. Los resultados se muestran cómo % de depleción de cisteína. (B) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con everolimus. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (C) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas de incubación con everolimus. (D) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con everolimus. Se muestran los resultados como expresión de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (% RFI). (E) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con alpelisib. Los resultados se muestran cómo % de depleción de cisteína. (F) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con alpelisib. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (G) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas de incubación con alpelisib. (H) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con alpelisib. Se muestran los resultados como expresión de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (%RFI). Los controles negativos utilizados fueron ácido láctico, isopropanol y 6-metilcumarina. Como controles positivos se utilizó DNCB, cinamaldehído (CA) y sulfato de níquel. Los resultados se expresan como media ± DE (n=3). La línea punteada indica el límite mínimo de positividad.

#### 4.1.8. Los taxanos tienen elevado potencial de sensibilización cutánea

Los taxanos son moléculas que interfieren en la replicación celular mediante la inhibición de los microtúbulos durante la mitosis. Son fármacos antineoplásicos que van a afectar a muchos tipos celulares ya que no tienen una diana específica. No obstante, dada la frecuencia de reacciones adversas cutáneas, se han incluido en la batería de fármacos a testar con nuestras técnicas de sensibilización. En el test de DPRA ambos compuestos provocaron un alto porcentaje de depleción de cisteína, superior al 70% a la concentración de 1 mM. En Keratinosens la emisión de luminiscencia se veía afectada por el potencial citotóxico de paclitaxel y docetaxel, que podría limitar la validez de la técnica. Por ello, en el caso de paclitaxel, las concentraciones a testar se seleccionaron tras realizar una curva de viabilidad desde el orden de nM hasta el orden microM, en el cual oscilarían en condiciones normales las concentraciones plasmáticas. La concentración más baja testada de paclitaxel fue 1nM, mostrando una viabilidad del 100% y una inducción de  $I_{m\acute{a}x} < 1.5$ . La segunda concentración testada fue 12.7 nM que a pesar de mostrar una menor viabilidad, aunque superior al 70% (76.47%), en el ensayo de luminiscencia mostró una  $I_{m\acute{a}x}$  de 5.59, superando la inducción que provocaron los controles positivos CA y DNCB. Con concentraciones superiores con un potencial citotóxico mucho mayor, la inducción de la luciferasa fue menor pero aún superando el rango de positividad de  $I_{m\acute{a}x} > 1.5$ . Docetaxel también mostró una  $I_{m\acute{a}x}$  superior a 1.5 incluso con tasas de viabilidad celular inferiores al 70%. En el ensayo h-CLAT ambos fármacos mostraron potencial para inducir la expresión de CD54 y CD86 por encima del umbral marcado para la positividad de la prueba. Con estos resultados, se puede concluir que los taxanos son un grupo con un potencial sensibilizante elevado que supera incluso a los controles positivos seleccionados con potencial sensibilizante demostrado.

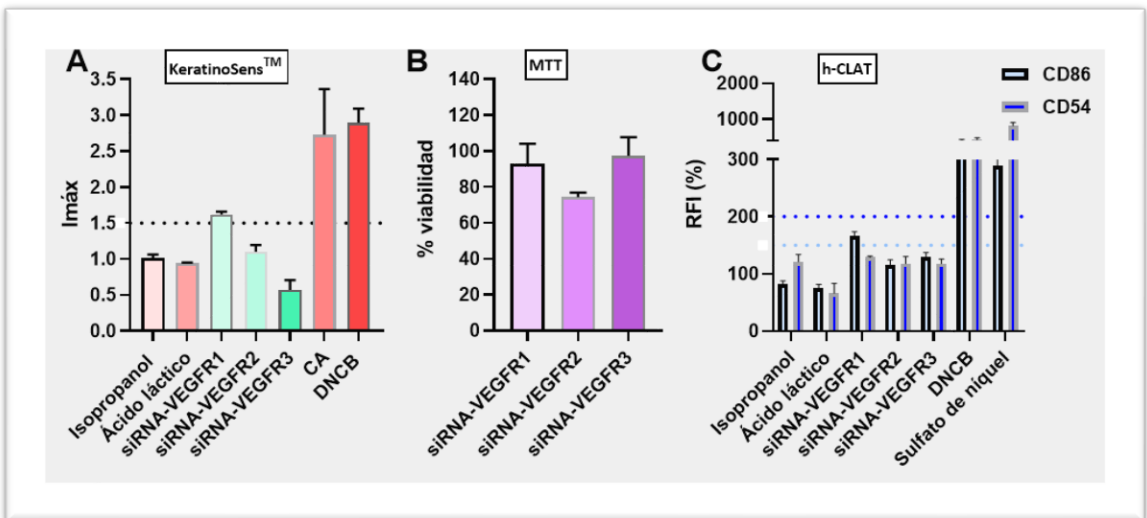




**Figura 48. Análisis de hipersensibilidad retardada de taxanos; paclitaxel y docetaxel.** (A) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con paclitaxel. Los resultados se muestran cómo % de depleción de cisteína. (B) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con paclitaxel. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (C) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas de incubación con paclitaxel. (D) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con paclitaxel. Se muestran los resultados como de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (% RFI). (E) Ensayo DPRA tras 24 horas de incubación con paclitaxel. Los resultados se muestran cómo % de depleción de cisteína. (F) Ensayo KeratinoSens™ tras 48 horas de incubación con paclitaxel. Se muestran los resultados como actividad de luciferasa (Imáx). (G) Viabilidad celular en ensayo MTT tras 48 horas de incubación con paclitaxel. (H) Ensayo h-CLAT tras 48 horas de incubación con paclitaxel. Se muestran los resultados como expresión de CD86 y CD54 mediante el índice de fluorescencia relativa (%RFI). Los controles negativos utilizados fueron ácido láctico, isopropanol y 6-metilcumarina. Como controles positivos se utilizó DNCB, cinamaldeído (CA) y sulfato de níquel. Los resultados se expresan como media ± DE (n=3). La línea punteada indica el límite mínimo de positividad.

#### 4.1.9. La inhibición de VEGFR1 provoca selectivamente sensibilización cutánea.

Debido al efecto de grupo observado por los inhibidores de VEGF testados (sunitinib, sorafenib, regorafenib y bevacizumab) se estudió la implicación de los distintos subtipos del receptor de VEGF en el desarrollo de sensibilización cutánea. Para ello se utilizaron ARN de silenciamiento (siARN) específicos para cada uno de los receptores y se realizaron las técnicas sobre las células tratadas. El ensayo DPRA no se pudo realizar por ser un método in-chemico. Los resultados muestran que el siARN-VEGFR1 activa la vía Nrf2 con una  $Imáx > 1.5$  y con una viabilidad del 100%. Además, el silenciamiento de VEGFR1 indujo la expresión de CD86 por encima de 150. El silenciamiento de VEGFR2, y VEGFR3 no provocó la inducción de la luciferasa en KeratinoSens, ni la expresión de CD54 y CD86. Estos resultados indican que la inhibición específica de VEGFR1 podría inducir sensibilización cutánea retardada.



**Figura 49. siRNA-VEGFR1 induce hipersensibilidad retardada.** (A) Representación de la actividad de luciferasa ( $Imáx$ ) tras 48 h de incubación con siARN-VEGF1, siARN-VEGF2 y siARN-VEGF3. (B) Viabilidad celular tras 48 h de incubación con siARN-VEGFR1, siRNA-VEGFR2 y siRNA-VEGFR3. (C) Representación de RFI (%) de CD86 y CD54 tras 48 h de incubación con siRNA-VEGFR1, siRNA-VEGFR2 y siRNA-VEGF3. Los controles negativos utilizados fueron isopropanol y ácido láctico (LA). Como control positivo se usó níquel sulfato (NS), DNCB y cinamaldeído (CA).

## RESULTADOS

Los resultados se muestran como la media  $\pm$  DE (n=3). La línea de puntos indica el umbral de positividad para cada técnica.

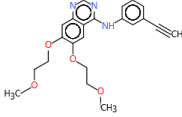
El silenciamiento de los 3 genes se confirmó mediante PCR mostrando una disminución de la expresión superior al 90% en los 3 casos.

### 4.2. Análisis SAR y predicción de sensibilización cutánea con QSAR toolbox

El análisis SAR permite identificar motivos estructurales en las moléculas objetivo que se han relacionado mecanísticamente con sensibilización cutánea. A continuación, se exponen los resultados resumidos en formato de tabla de los fármacos testados, a excepción de los anticuerpos monoclonales por su condición de medicamento biológico y su estructura macromolecular. La herramienta QSAR toolbox también se utilizó para realizar una predicción de sensibilización según el flujo de trabajo definido.

#### 4.2.1. Fármacos antiEGFR

Erlotinib no reportó ninguna coincidencia en el análisis SAR según el flujo de trabajo definido. Según el flujo de trabajo definido, no se pudo realizar la categorización estructural por no encontrar ninguna coincidencia estructural y por tanto el resultado de la predicción fue indeterminado

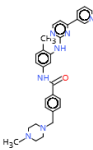
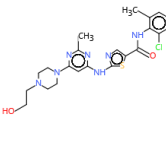
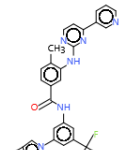
		
Fármaco		Erlotinib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas

	Unión a Lys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas
	KeratioSens	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Sin coincidencias SAR
	Sensibilización cutánea	Sin coincidencias SAR
Predicción		Indeterminado*

**Tabla 25.** Análisis SAR de erlotinib mediante QSAR toolbox. No se reportaron coincidencias de relación estructura química actividad. El resultado de la predicción QSAR fue indeterminado. \*Indeterminado por no poder ser categorizado.

#### 4.2.2. Fármacos inhibidores del BCR-ABL

El análisis SAR de los inhibidores BCR-ABL mostró resultados dispares en cuanto a las estructuras identificadas. Dasatinib presenta un grupo monohaloareno y un grupo hidroxilo. Mientras que imatinib y nilotinib el grupo característico identificado con potencial de sensibilización son las amidas N-sustituidas. El mecanismo identificado para los 3 fue la acilación. Los resultados de la predicción fueron positivos para nilotinib y negativos para imatinib y dasatinib.

				
Fármaco		Imatinib	Dasatinib	Nilotinib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas	Alcoholes Monohaloarenos	Sin alertas de unión a proteínas

Unión a Lys (DPRA)	Amidas aromáticas N- sustituidas	Alcoholes Monohaloarenos	Amidas aromáticas N- sustituidas
Keratinosen	Alta expresión génica	Sin coincidencias SAR	Sin coincidencias SAR
h-CLAT	Amidas aromáticas N- sustituidas	Monohaloarenos	Amidas aromáticas N- sustituidas
Sensibilización cutánea	Acilación	Acilación	Acilación
Predicción	Negativo	Negativo	Positivo

**Tabla 26.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de imatinib, dasatinib y nilotinib. Se muestra los resultados reportados por QSAR toolbox según el flujo de trabajo definido.

### 4.2.3. Fármacos inhibidores de VEGFR

Los resultados reportados por el análisis SAR muestran como grupo con potencial sensibilizante de sunitinib y regorafenib un monohaloareno. Además, sunitinib presenta un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado y se propone la adición de Michel como potencial mecanismo de reacción. La predicción para sunitinib fue positiva y negativa en el caso de regorafenib. Sorafenib reportó resultados experimentales en el tercer

## RESULTADOS

apartado de flujo de trabajo definido que indican un resultado negativo para la sensibilización cutánea.

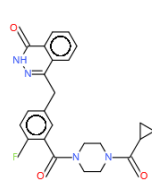
Fármaco		Sunitinib	Sorafenib	Regorafenib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Monohaloarenos	Sin alertas de unión a proteínas	Monohaloarenos
	Unión a Lys (DPRA)	Monohaloarenos	Sin alertas de unión a proteínas	Monohaloarenos
	KeratinoSens	Sin coincidencias SAR	Sin coincidencias SAR	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Monohaloarenos	Sin coincidencias SAR	Monohaloarenos

	Sensibilización cutánea	Adición de Michel: carbonilo alfa-beta con doble enlace polarizado	Sin coincidencias SAR	Sin coincidencias SAR
Predicción		Positivo	Negativo*	Negativo

**Tabla 27.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de sunitinib, sorafenib y regorafenib. Se muestran los resultados del análisis SAR con QSAR toolbox y la predicción de sensibilización según el flujo de trabajo definido. \*Negativo según datos experimentales reportados para sorafenib

#### 4.2.4. Fármacos inhibidores de PARP

No se encontraron coincidencias de estructura actividad en cuanto a sensibilización cutánea según el flujo de trabajo definido para olaparib. No se pudo categorizar y por tanto el resultado de la predicción fue indeterminado.

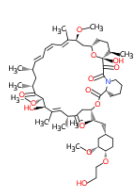
		
Fármaco		Olaparib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas
	Unión a Lys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas
	KeratinoSens	Sin coincidencias SAR

	h-CLAT	Sin coincidencias SAR
	Sensibilización cutánea	Sin coincidencias SAR
Predicción		Indeterminado*

**Tabla 28.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de olaparib. No se reportan coincidencias en el análisis estructura actividad según el flujo de trabajo definido. \*Indeterminado por no poder ser categorizado.

#### 4.2.5. Fármacos inhibidores de mTOR

Everolimus presenta varios grupos identificados en el análisis SAR con potencial sensibilizante cutáneo; alcoholes y ácidos carboxílicos, ésteres no conjugados y cetonas no conjugadas. El mecanismo propuesto de sensibilización fue adición nucleofílica. La predicción fue negativa.

		
Fármaco		Everolimus
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Alcoholes Ácidos carboxílicos y ésteres no conjugados
	Unión a Lys (DPRA)	Alcoholes Ácidos carboxílicos y ésteres no conjugados

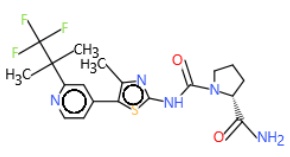


		Cetonas no conjugadas
	KeratinoSens	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Lactonas
	Sensibilización cutánea	Adición nucleofílica: cetonas
Predicción		Negativo

**Tabla 29.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de everolimus. Se muestra análisis SAR reportado con QSAR toolbox y predicción según el flujo de trabajo definido para everolimus.

#### 4.2.6. Fármacos inhibidores de PI3K

En el estudio de la relación estructura – actividad de alpelisib no se reportaron de grupos con potencial de unión a proteínas. Tampoco se reportaron resultados de coincidencias en el análisis SAR para KeratinoSens, h-CLAT ni para la sensibilización cutánea. Por tanto, no se encontraron análogos estructurales relacionados y no se pudo categorizar la molécula y realizar la predicción.

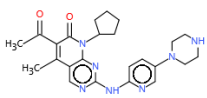
		
Fármaco		Alpelisib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas
	Unión a Lys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas

	KeratinoSens	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Sin coincidencias SAR
	Sensibilización cutánea	Sin coincidencias SAR
Predicción		Indeterminado*

**Tabla 30** . Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de alpelisib. No se reportan coincidencias en el análisis estructura actividad según el flujo de trabajo definido. \*Indeterminado por no poder ser categorizado

#### 4.2.7. Fármacos inhibidores de ciclinas

Palbociclib contiene varias estructuras relacionadas con potencial sensibilizante; cetonas  $\alpha,\beta$ -conjugadas y N-carbonil heteroaril aminas. Los potenciales mecanismos propuestos de sensibilización según el análisis SAR fue adición nucleofílica y acilación. La predicción fue indeterminada por no encontrar análogos en la categorización. Esto puede ser debido a que en el flujo de trabajo se determinó como conector booleano “AND” en los mecanismos reportados de sensibilización cutánea. En el caso de palbociclib que reportó dos mecanismos diferentes pudo suponer un análisis restrictivo que comprometió el resultado de la categorización y de la posterior predicción.

		
Fármaco		Palbociclib
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Sin alertas de unión a proteínas

	Unión a Lys (DPRA)	Cetonas conjugadas alfa-beta insaturadas
	KeratioSens	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Cetona alfa-beta insaturada
	Sensibilización cutánea	Adición nucleofílica: cetonas Acilación: N-carbonil heteroaril aminas
Predicción		Indeterminado* sin análogos en la categorización

**Tabla 31.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de palbociclib. Se muestran resultados reportados del análisis SAR y la predicción de sensibilización según el flujo de trabajo definido para palbociclib. \*Indeterminado por no categorización

#### 4.2.8. Taxanos

En el análisis de relación estructura actividad de paclitaxel y docetaxel se identificaron varias estructuras con potencial sensibilizante. Además, se identificaron 2 potenciales mecanismos estructurales de sensibilización comunes a ambas moléculas; adición nucleofílica por presencia de cetonas y sustitución nucleofílica por presencia de grupos alquil ésteres. Para docetaxel se identificó un tercer potencial mecanismo sensibilizante mediante acilación por la presencia de carbamatos. La predicción de sensibilización fue indeterminada, probablemente, debida al número de estructuras sensibilizantes y el flujo de trabajo definido para la categorización, en el cual, para categorizar una molécula objetivo deben encontrarse análogos que contengan todos los grupos identificados.

Fármaco		Paclitaxel	Docetaxel
Profiling	Unión a Cys (DPRA)	Alcoholes Ácidos carboxílicos y esteres no conjugados Amidas N-sustituidas	Alcoholes Ácidos carboxílicos y esteres no conjugados
	Unión a Lys (DPRA)	Alcoholes Ácidos carboxílicos y esteres no conjugados Amidas N-sustituidas Monocetona no conjugada	Alcoholes Ácidos carboxílicos y esteres no conjugados Amidas N-sustituidas Monocetona no conjugada
	KeratinoSens	Sin coincidencias SAR	Sin coincidencias SAR
	h-CLAT	Sin coincidencias SAR	Carbamatos
	Sensibilización cutánea	Adición nucleofílica: cetonas Sustitución sn2: Alquil esteres y tioesteres	Adición nucleofílica: cetonas Sustitución sn2: Alquil esteres y tioesteres

			Acilación: Carbamatos
Predicción		Indeterminado*Sin categorización	Indeterminado*Sin categorización

**Tabla 32.** Análisis SAR y predicción con QSAR toolbox de palbociclib. Se muestran resultados reportados del análisis SAR y la predicción de sensibilización según el flujo de trabajo definido para palbociclib. \*Indeterminado por no categorización.



# 5. DISCUSIÓN





El desarrollo de fármacos de terapia oncológica dirigida ha sido una revolución en el tratamiento de las enfermedades oncológicas, tanto a nivel de resultados como a nivel de reacciones adversas en comparación con la quimioterapia convencional. No obstante, aunque las toxicidades que producen suelen ser menos graves que la quimioterapia convencional también tiene efectos adversos que pueden llegar a comprometer la continuidad del tratamiento. Algunos de estos efectos adversos son propios de cada fármaco y otros son efectos característicos de la diana molecular y por tanto se pueden clasificar como reacciones adversas por grupo terapéutico. Por ello es importante, identificar la potencial toxicidad y su mecanismo de acción tóxico. La toxicidad a nivel cutáneo es una de las más frecuentes entre estos fármacos. Todos estos fármacos son moléculas pequeñas (<1000 Da) y por tanto son susceptibles de ser reconocidas por linfocitos T y desencadenar una reacción de hipersensibilidad según el mecanismo propuesto por la OCDE y que son los puntos clave que se estudian mediante las técnicas utilizadas.

Los fármacos anti-EGFR provocan con elevada frecuencia toxicidad cutánea, caracterizada por piel seca, prurito y erupción acneiforme [151]. Es especialmente importante caracterizar el mecanismo de acción de la toxicidad de estos fármacos porque se ha demostrado una correlación entre la aparición de toxicidad cutánea la respuesta del tumor [152,153]. Se han llegado a diseñar estudios clínicos en este sentido, buscando una dosificación de erlotinib capaz de provocar rash cutáneo, observándose un aumento de la supervivencia en pacientes sometidos a una escalada de dosis hasta aparición de rash grado 2[154]. El tratamiento con fármacos anti-EGFR provoca cambios en el perfil de marcadores inflamatorios sistémicos que se relacionan con el aumento de rash cutáneo y se observa un aumento del recuento celular en pacientes que desarrollan toxicidad cutánea[155]. En ratones con ablación para el gen EGFR se observan lesiones cutáneas similares a las observadas en pacientes tratados con terapia anti-EGFR. En el análisis histológico de estos ratones se observan infiltrados celulares compuestos por neutrófilos y linfocitos que indican el

componente inflamatorio de las lesiones. Estos infiltrados se caracterizan por el elevado número de neutrófilos y macrófagos [155] lo que sugiere un mecanismo tóxico guiado por inmunidad innata no específica, lo cual concuerda los resultados obtenidos en nuestras técnicas in vitro que revelan la elevada citotoxicidad de erlotinib sobre los keratinocitos, pero descartan el carácter sensibilizante de estas moléculas. Esta citotoxicidad podría ser uno de los factores desencadenantes del reclutamiento de células inflamatorias. El análisis SAR no reportó alertas de sensibilización para erlotinib. Sin embargo, el ensayo DPRA fue positivo. Esto puede ser debido a transformaciones metabólicas de erlotinib con metabolitos resultantes con potencial electrofílico, ya que en el análisis SAR no se tuvo en cuenta el metabolismo de las moléculas. No obstante, se ha observado que la actividad metabólica de erlotinib, medida como el ratio erlotinib/O-desmetil-erlotinib, se correlaciona con mayores tasas de supervivencia y de rash cutáneo. [156]. Es decir, que a mayor concentración de erlotinib en relación con su metabolito, mayores tasas de respuesta y rash cutáneo. Otro factor importante es la biodisponibilidad en piel, ya que se trata de terapias sistémicas y la toxicidad, tanto por sensibilización como por toxicidad directa, implica que el fármaco debe tener buena disponibilidad en la piel. Se ha observado mayor concentración de fármaco en biopsias de piel de pacientes que desarrollan rash cutáneo frente a pacientes que no tienen toxicidad cutánea [157]. Por lo que parece estar relacionada la biodisponibilidad en piel con la aparición de toxicidad cutánea. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de toxicidad cutánea por citotoxicidad más que por un mecanismo de sensibilización.

Los inhibidores de VEGFR pueden provocar reacciones cutáneas como rash o despigmentación de la piel [158]. pero el efecto adverso cutáneo más frecuente y con incidencia en la mayoría de los inhibidores de VEGFR es el síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar (EPP) [159]. El efecto citotóxico demostrado en nuestros estudios de viabilidad con queratinocitos es conocido y se considera potencialmente responsable de este efecto adverso característico. Además del propio

efecto antiangiogénico que también podría tener relevancia en el desarrollo de este cuadro clínico [160]. En este estudio se propone la inhibición de VEGFR-2 como mecanismo implicado en el desarrollo de EPP, mediante un screening de inhibición de VEGFR-2 de moléculas que provocan EPP. No obstante, no se estudió la inhibición del resto de receptores de VEGF (VEGFR-1 y VEGFR-3) y la mayoría de los fármacos inhibidores de VEGFR no son selectivos de ningún receptor específico del VEGF. Por otro lado, existe un componente inflamatorio implicado en el desarrollo de la EPP que se evidencia tanto por las características clínicas, sobre todo a nivel temprano y que pueden ser un síntoma prodrómico de la EPP (160), como por los hallazgos histopatológicos que muestran infiltrados linfocitarios en biopsias de pacientes con EPP [161,162]. No obstante, el hallazgo histológico más representativo es la presencia de queratinocitos necróticos que aparece en los casos graves (grado III-IV) de EPP y que es utilizado como criterio para el diagnóstico y el estadiaje de la enfermedad (160). Teniendo en cuenta estos antecedentes y el importante rol que tiene la citotoxicidad sobre queratinocitos en el desarrollo de la EPP, nuestros experimentos confirman el efecto citotóxico de los fármacos anti-VEGFR sobre queratinocitos. Además, nuestros resultados muestran el potencial sensibilizante de estos fármacos que podría contribuir al desarrollo de la EPP, lo cual explicaría mecanísticamente el componente inflamatorio. Es relevante el hallazgo observado mediante los experimentos de silenciamiento génico específico de los 3 receptores de VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3), que revela la implicación selectiva del receptor 1 de VEGF en el desarrollo de sensibilización cutánea y que podría estar implicado en el desarrollo de toxicidad cutánea por estos fármacos y sumado al efecto citotóxico sobre los queratinocitos podría ser responsable del mecanismo fisiopatológico del desarrollo de EPP. Esta idea concuerda con los hallazgos clínicos en los que se ha observado un aumento de la incidencia de EPP en pacientes tratados con sorafenib + bevacizumab en comparación con sorafenib en monoterapia [163]. Un metanálisis revela el aumento del riesgo de sufrir EPP en el tratamiento

concomitante de un anticuerpo monoclonal anti VEGFR junto a otros inhibidores multiquinasa [164]. El menor potencial citotóxico de bevacizumab sobre queratinocitos demostrado en los estudios de viabilidad celular refuerza la teoría de la implicación de la inhibición de VEGFR-1 en el desarrollo de la EPP.

La predicción según el análisis SAR por análogos estructurales reportó resultados positivos para sunitinib, con la identificación de grupos químicos con potencial electrófilo de tipo adición de Michael. Sorafenib a pesar de no poder ser clasificado en un grupo por no reportar características químicas con potencial electrófilo, resultó ser negativo por haber reportado resultados negativos en el ensayo LLNA [165]. Nuestros resultados según las técnicas propuestas por la OCDE para sustituir a la experimentación animal contradicen estos resultados y podría haber una disociación de resultados entre las diferentes técnicas in-vivo frente a las técnicas in-vitro/in-chemico. Teniendo en cuenta las evidencias clínicas e histológicas es probable que las técnicas ensayadas en este trabajo tengan mayor potencial de predicción de sensibilización que el ensayo de LLNA en moléculas destinadas a su uso sistémico y no tópico. No obstante, son necesarias futuras investigaciones que confirmen estos resultados. En el caso concreto de los inhibidores VEGFR se abre la posibilidad una implicación mecanística mediada por la inhibición de VEGFR-1 que provoca cambios inflamatorios similares a los producidos en una reacción de sensibilización, lo cual justificaría la disociación entre el análisis SAR y los resultados obtenidos en nuestros experimentos. La toxicidad cutánea el desarrollo de EPP según los mecanismos propuestos implica que los fármacos deben tener buena biodisponibilidad en piel. Esta biodisponibilidad está condicionada tanto por propiedades químicas que afectan a la distribución como por transportadores celulares. La actividad de la glicoproteína-P y del BCRP ha demostrado disminuir la exposición dérmica de regorafeinb [166].

Los inhibidores del BCR-ABL son fármacos muy eficaces en el tratamiento la LMC y generalmente bien tolerados. Las reacciones adversas cutáneas son el principal

efecto adverso no hematológico de este grupo de fármacos[167,168]. Generalmente son reacciones de tipo pruriginoso que se manifiestan en forma de erupción maculopapular y que se suelen responder a corticoterapia [167]. Se han descrito numerosas alteraciones a nivel cutáneo entre las que se encuentran despigmentación, reacciones liquenoides o el síndrome de Stevens-Johnson [167]. Estas reacciones se han descrito para todos los inhibidores del BCR-ABL tanto individualmente como reacciones cruzadas entre ellos[169–171] El mecanismo de acción tóxico de estos fármacos no está bien definido. No obstante, varias de las reacciones descritas, como la reacción liquenoide o el síndrome de Stevens-Johnson se consideran reacciones de hipersensibilidad celular compatible con una reacción de hipersensibilidad de tipo IV [172–175]. El análisis SAR muestra potencial electrofílico mediante una reacción de acilación, por lo que podrían actuar como haptenos desencadenantes de una reacción de hipersensibilidad tipo IV desde el punto de vista estructural. A pesar de que la predicción mediante el análisis de estructura química fue negativa para imatinib y dasatinib, los resultados experimentales revelan un potencial efecto de toxicidad por sensibilización de grupo terapéutico. La toxicidad por imatinib a nivel cutáneo parece estar relacionada con el aumento de expresión de IL-31 e IL-33 que son producidas por mastocitos y queratinocitos, entre otros [176]. La IL-31 participa en el desarrollo de prurito de carácter inflamatorio como dermatitis atópica, dermatitis de contacto y urticaria crónica[176]. La IL-31 se estimula por especies reactivas de oxígeno [177], que son el desencadenante de la disociación de Nrf2 en queratinocitos en respuesta haptenos y que es el objeto de estudio en el ensayo de KeratinoSens<sup>TM</sup>. Teniendo en cuenta la presentación clínica de este grupo de fármacos y los resultados de nuestros experimentos se evidencia el potencial sensibilizante de los fármacos inhibidores del BCR-ABL. No obstante, como ya se adelantó en la introducción estos fármacos son poco selectivos del BCR-ABL y se consideran fármacos inhibidores multikinasa [123], por tanto, parece complicado asociar este efecto a la inhibición del BCR-ABL. Entre los receptores tirosina quinasa que inhiben estos fármacos está el PDGFR, que

algunos autores ya habían relacionado con reacciones de sensibilización cutánea para estos fármacos. Por tanto, sería necesario, nuevas investigaciones que intenten identificar específicamente cuál de estas dianas puede ser la responsable de la toxicidad cutánea de estos fármacos.

Los inhibidores de PARP son fármacos bien tolerados a nivel cutáneo y la incidencia de reacciones adversas a este nivel es muy baja [178,179]. Se han descrito reacciones de fotosensibilidad asociadas a olaparib [180]. La deficiencia de PARP-1 ha demostrado incrementar el daño por radiación UVB en queratinocitos mediante la regulación de la vía EGFR dependiente de ROS[181]. En este estudio, los autores llevaron a cabo un ensayo de MTT con olaparib 10  $\mu$ M, obteniendo resultados similares a nuestros ensayos y confirmando que olaparib no es citotóxico para queratinocitos. Según estos experimentos, la activación de PARP-1 mediante radiación UVB aumentaría la generación de ROS e indirectamente provocaría la activación de EGFR lo cual conllevaría a una respuesta inflamatoria.[181]. El análisis SAR no reportó alertas de sensibilización ni se identificaron grupos potenciales en la molécula de olaparib, concordando con los datos clínicos y experimentales obtenidos y por tanto podemos concluir que olaparib y por extensión, la inhibición de PARP no es una diana potencialmente causante de sensibilización cutánea.

La inhibición de PI3K mediante alpelisib es una diana de reciente implicación en terapéutica y los resultados en la práctica clínica a nivel de seguridad todavía están por definir, sobre todo en condiciones de práctica clínica habitual. No obstante, los ensayos clínicos reportaron un alto porcentaje de reacciones adversas cutáneas en los pacientes tratados con alpelisib, incluyendo rash de cualquier tipo y prurito con porcentajes de afectación de cualquier grado del 30% y hasta del 10% de grado 3 [182]. Dada la novedad terapéutica y la poca experiencia con el uso del fármaco, es importante intentar elucidar los mecanismos de toxicidad. Según nuestros experimentos la toxicidad cutánea de alpelisib podría estar provocada por toxicidad

directa sobre queratinocitos, basándonos en el ensayo de viabilidad celular. En base al análisis SAR y en los resultados de las pruebas de sensibilización parece que el mecanismo de sensibilización cutánea podría descartarse. Estudios recientes de la farmacocinética y farmacodinamia de alpelisib muestran un elevado porcentaje de distribución a nivel cutáneo[183]. Como muestra el ensayo de citotoxicidad existe una relación dosis-respuesta que podría explicar la toxicidad cutánea mediante citotoxicidad directa al tener una elevada biodisponibilidad en piel.

El segundo grupo de fármacos que actúan en la vía PI3K/Akt/mTOR mostró resultados negativos para la sensibilización cutánea según la regla 2 de 3 utilizada en nuestros experimentos. No obstante, los resultados obtenidos en el ensayo h-CLAT pueden tomarse con precaución ya que los inhibidores de mTOR disminuyen la activación de células dendríticas [184]. Los efectos de la inhibición de mTOR a nivel del sistema inmune son extensos y afectan tanto a la inmunidad innata como a la adquirida [185]. La predicción SAR fue negativa, sin embargo, se identificaron varios elementos estructurales capaces de desencadenar el primer paso de la sensibilización cutánea y se propone la adición nucleofílica como posible mecanismo de acción. Estos datos, concuerdan con nuestros resultados experimentales, en los cuales, el ensayo DPRA fue positivo, evidenciando el carácter electrófilo del fármaco y el potencial de interactuar con residuos nucleofílicos de las proteínas tisulares. Contextualizando con la clínica, son frecuentes las reacciones adversas de tipo rash cutáneo en el tratamiento con estos fármacos [186] que son más características de una reacción alérgica mediada por IgE. Por tanto, teniendo en cuenta nuestros resultados, el análisis SAR y las características clínicas, así como las consecuencias inmunosupresoras de la inhibición de mTOR se puede considerar que los fármacos que inhiben esta vía no son sensibilizantes cutáneos.

Los inhibidores de ciclinas dependientes de quinasas 4 y 6 reportan entre un 11 y 18% de reacciones adversas cutáneas, generalmente de grados leves [187]. En estudios

recientes que profundizan en este efecto proponen la toxicidad cutánea como efecto de grupo de los inhibidores CDK4/6 [188]. Entre las reacciones adversas descritas para este grupo de fármacos se encuentran reacciones tipo rash, eritematosas y pruriginosas que suelen manejarse con corticoterapia [188]. También se han descrito casos de SSJ en pacientes tratados con estos fármacos, pero no se ha dilucidado el mecanismo de acción tóxico. El análisis SAR reportó potencial electrófilo por la presencia de cetonas  $\alpha,\beta$  - insaturadas. Sin embargo, el ensayo de DPRA que pone de manifiesto la capacidad de reaccionar con residuos nucleofílicos de la cisteína resultó negativo. El potencial tóxico sobre queratinocitos también fue bajo con una viabilidad celular cercana al 70% y los ensayos de h-CLAT y keratinoSens<sup>TM</sup> fueron negativos por lo que nuestros experimentos indican que la toxicidad cutánea de estos fármacos no se debe a un mecanismo de sensibilización cutánea.

El grupo de taxanos se seleccionó por su elevada frecuencia de reacciones de hipersensibilidad, sobre todo hipersensibilidad inmediata mediada por IgE. Estas reacciones están potenciadas por el excipiente utilizado en la presentación comercial más habitual de paclitaxel, que es el cremophor®. No obstante, también se describen con frecuencia reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado que suelen manifestarse en forma de erupciones, rash maculopapular y en algunos casos se ha descrito el SSJ en pacientes tratados con paclitaxel [189]. Estudios moleculares confirman el potencial de paclitaxel de provocar reacciones retardadas de hipersensibilidad de tipo IV, demostrando una respuesta de hipersensibilidad de tipo celular mediada por linfocitos.[190] Por tanto, el hecho de tener un compuesto con evidencia de provocar dermatitis de contacto por vía sistémica nos sirve para validar la sensibilidad de las técnicas para identificar compuestos sensibilizantes por esta vía. Debido al elevado potencial tóxico de paclitaxel realizamos una curva de viabilidad celular para seleccionar concentraciones que nos permitieran una viabilidad suficiente para evaluar el potencial de respuesta en el ensayo de KeratinoSens<sup>TM</sup>. De esta manera podemos observar que a concentraciones muy bajas los taxanos son capaces de



desencadenar esta respuesta. Además, fueron positivos en DPRA en concordancia con el análisis SAR que reportó numerosos motivos estructurales con potencial electrófilo como alcoholes, amidas N-sustituídas y ácidos carboxílicos. Por último, y para confirmar el potencial de desarrollo de reacciones de hipersensibilidad retardada, estos fármacos también demostraron ser capaces de inducir la activación de células dendríticas mediante el ensayo h-CLAT. Con todos estos resultados experimentales podemos afirmar que los taxanos son fármacos sensibilizantes cutáneos.

La positividad de los taxanos en nuestros experimentos sirve para confirmar la capacidad de las técnicas de la OCDE para identificar fármacos sensibilizantes administrados por vía sistémica. No obstante, estas técnicas tienen importantes limitaciones como los problemas de precipitación en el ensayo DPRA o la limitación de fármacos citotóxicos que interfieren en los resultados de KeratinoSens® y limitan la interpretación de los resultados de estas técnicas. El análisis SAR supone una herramienta complementaria al estudio del potencial sensibilizante de las técnicas experimentales, aportando una visión desde el punto de vista estructural que apoya el análisis y el juicio sobre el potencial y el mecanismo de toxicidad cutánea de la sustancia problema. Por tanto, se pueden utilizar ambas técnicas (experimentales y computacionales) para obtener un análisis mecanístico y predictivo del potencial sensibilizante de compuestos antineoplásicos sistémicos. Estas técnicas son útiles sobre todo en moléculas con un potencial de sensibilización elevado que a concentraciones bajas consigan estimular la producción de ROS ya que a concentraciones elevadas se puede observar toxicidad sobre queratinocitos que limite la interpretabilidad de los resultados en esta técnica. Los taxanos son buen ejemplo de ello, ya que, aun siendo moléculas altamente tóxicas, a concentraciones inferiores a las tóxicas son capaces de estimular el gen de la luciferasa y revelar el potencial sensibilizante de estas moléculas.



# 6. CONCLUSIONES



- Las técnicas propuestas por la OCDE para la caracterización de sustancias sensibilizantes son útiles para predecir el potencial sensibilizante de fármacos antineoplásicos de terapia dirigida
- Las características ideales de los fármacos para la interpretabilidad de las técnicas son fármacos con elevado potencial sensibilizante y con óptimas propiedades de solubilidad.
- Las técnicas experimentales (KeratinoSens<sup>TM</sup>, DPRA y h-Clat) y las técnicas computacionales (Análisis SAR) pueden utilizarse de manera complementaria para categorizar el potencial sensibilizante de los fármacos antineoplásicos.
- Las limitaciones principales de la aplicabilidad de estas técnicas son la toxicidad celular en queratinocitos, en el caso de KeratinoSens<sup>TM</sup>, y las características fisicoquímicas en el caso de DPRA.
- Los inhibidores de EGFR no son sensibilizantes cutáneos, pero son tóxicos para queratinocitos. No podemos considerar que la elevada toxicidad cutánea a este grupo de fármacos se deba a un mecanismo de hipersensibilidad retardada.
- Los inhibidores del BCR-ABL inducen hipersensibilidad retardada. No obstante, el elevado número de quinasas inhibidas por este grupo de fármacos impide asociar este efecto a esta diana terapéutica.
- Los inhibidores de VEGFR tienen potencial de sensibilización cutánea. Existe un efecto de grupo de estos fármacos ya que todos mostraron resultados positivos en las técnicas experimentales. Este efecto podría explicar mecanísticamente la aparición de eritrodistesia palmoplantar, que es una reacción adversa común de este grupo de fármacos.
- La inhibición específica de VEGFR1 es capaz de inducir hipersensibilidad retardada. Es la primera vez que se asocia específicamente potencial de sensibilización a un receptor específico del VEGFR, como se ha evidenciado

## | CONCLUSIONES

con los experimentos de silenciamiento génico de VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3.

## 7. BIBLIOGRAFIA





- [1] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2*. Elsevier Editora Ltda 2015.
- [2] Kay AB. Landmarks in allergy during the 19th century. *Chem Immunol Allergy* 2014;100:21–6. <https://doi.org/10.1159/000358477>.
- [3] Turk JL. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. vol. 80. 1987.
- [4] Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical Aspects of Immunology*. Clinical Aspects of Immunology 1963.
- [5] Hostoffer RW, Joseph N. *Immunoglobulin E*. StatPearls Publishing; 2020.
- [6] Hulett MD, McKenzie IFC, Hogarth PM. Chimeric Fc receptors identify immunoglobulin-binding regions in human FcγRII and FcεRI. *Eur J Immunol* 1993;23:640–5. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230310>.
- [7] Galli SJ, Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:693–704. <https://doi.org/10.1038/nm.2755>.
- [8] Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008;8:205–17. <https://doi.org/10.1038/nri2273>.
- [9] Campbell AM, Vachier I, Chanez P, Vignola AM, Lebel B, Kochan J, et al. Expression of the high-affinity receptor for IgE on bronchial epithelial cells of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:92–7. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.19.1.2648>.
- [10] Campbell AM, Vignola AM, Chanez P, Godard P, Bousquet J. Low-affinity receptor for IgE on human bronchial epithelial cells in asthma. *Immunology* 1994;82:506–8.
- [11] Palaniyandi S, Tomei E, Li Z, Conrad DH, Zhu X. CD23-Dependent Transcytosis of IgE and Immune Complex across the Polarized Human Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 2011;186:3484–96. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002146>.
- [12] Palaniyandi S, Liu X, Periasamy S, Ma A, Tang J, Jenkins M, et al. Inhibition of CD23-mediated IgE transcytosis suppresses the initiation and development of allergic airway inflammation. *Mucosal Immunol* 2015;8:1262–74. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.16>.
- [13] Perkins TN, Donnell ML, Oury TD. The axis of the receptor for advanced glycation endproducts in asthma and allergic airway disease. *Allergy* 2020;all.14600. <https://doi.org/10.1111/all.14600>.

- [14] Lee T-H, Song HJ, Park C-S. Role of inflammasome activation in development and exacerbation of asthma. *Asia Pac Allergy* 2014;4:187. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2014.4.4.187>.
- [15] Simpson JL, Phipps S, Baines KJ, Oreo KM, Gunawardhana L, Gibson PG. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *European Respiratory Journal*, vol. 43, European Respiratory Society; 2014, p. 1067–76. <https://doi.org/10.1183/09031936.00105013>.
- [16] Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, Robertson AAB, Baines KJ, Brown AC, et al. Role for NLRP3 inflammasome-mediated, IL-1 $\beta$ -dependent responses in severe, steroid-resistant asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;196:283–97. <https://doi.org/10.1164/rccm.201609-1830OC>.
- [17] Iweala OI, Wesley Burks A. Food allergy: Our evolving understanding of its pathogenesis, prevention, and treatment. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16:1–10. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0616-7>.
- [18] Iweala OI, Burks AW. IgE producers in the gut expand the gut’s role in food allergy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020;17:384–6. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0309-5>.
- [19] Nowak-Wegrzyn A, Szajewska H, Lack G. Food allergy and the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:241–57. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.187>.
- [20] Kambe N, Kitao A, Nishigori C, Miyachi Y. Late-phase Urticaria Update. *Curr Allergy Asthma Rep* 2002;2:288–91.
- [21] González-Deolano D, Álvarez-Twose I. Mast cells as key players in allergy and inflammation. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2018;28:365–78. <https://doi.org/10.18176/jiaci.0327>.
- [22] Michel M, Cooper N, Jean C, Frizzera C, Bussel JB. Does *Helicobacter pylori* initiate or perpetuate immune thrombocytopenic purpura? *Blood* 2004;103:890–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0900>.
- [23] Rajan SK, Espina BM, Liebman HA. Hepatitis C virus-related thrombocytopenia: clinical and laboratory characteristics compared with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2005;129:818–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05542.x>.
- [24] McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000;37:239–48. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(00\)90102-1](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(00)90102-1).

- [25] Zhao C, Li X, Zhang F, Wang L, Peng J, Hou M. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies. *Haematologica* 2008;93:1428–30. <https://doi.org/10.3324/haematol.12889>.
- [26] Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, et al. Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: Relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. *Arthritis Rheum* 2002;46:2148–59. <https://doi.org/10.1002/art.10420>.
- [27] Katsumata Y, Suzuki T, Kuwana M, Hattori Y, Akizuki S, Sugiura H, et al. Anti-c-Mpl (thrombopoietin receptor) autoantibody-induced amegakaryocytic thrombocytopenia in a patient with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1647–51. <https://doi.org/10.1002/art.10965>.
- [28] Ichikawa T, Shimojima Y, Otuki T, Ueno K ichi, Kishida D, Sekijima Y. Acquired amegakaryocytic thrombocytopenia in adult-onset still's disease: Successful combination therapy with tocilizumab and cyclosporine. *Internal Medicine* 2019;58:3473–8. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.2929-19>.
- [29] Marini I, Bakchoul T. Pathophysiology of Autoimmune Thrombocytopenia: Current Insight with a Focus on Thrombopoiesis. *Hamostaseologie* 2019;39:227–37. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1678732>.
- [30] Sánchez-Pérez J, García-Díez A. Pemphigus. *Actas Dermosifiliogr* 2005;96:329–56. [https://doi.org/10.1016/s0001-7310\(05\)73090-8](https://doi.org/10.1016/s0001-7310(05)73090-8).
- [31] Brenner S, Goldberg I. Drug-induced pemphigus. *Clin Dermatol* 2011;29:455–7. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.01.016>.
- [32] Newby CS, Barr RM, Greaves MW, Mallet AI. Cytokine release and cytotoxicity in human keratinocytes and fibroblasts induced by phenols and sodium dodecyl sulfate. *Journal of Investigative Dermatology* 2000;115:292–8. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00056.x>.
- [33] MICHEL B, KO CS. An organ culture model for the study of pemphigus acantholysis. *British Journal of Dermatology* 1977;96:295–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1977.tb06141.x>.
- [34] Mak TW, Saunders ME. Allergy and Hypersensitivity. *The Immune Response*, Elsevier; 2006, p. 923–62. <https://doi.org/10.1016/b978-012088451-3.50030-2>.

- [35] YELL JA, MBUAGBAW J, BURGE SM. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *British Journal of Dermatology* 1996;135:355–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1004.x>.
- [36] Sanidad M de., Sociedad Española de Reumatología. GPC LES. Canarias. Sociedad Española de Reumatología 2015.
- [37] Fayyaz A, Igoe A, Kurien BT, Danda D, James JA, Stafford HA, et al. Haematological manifestations of lupus. *Lupus Sci Med* 2015;2:78. <https://doi.org/10.1136/lupus-2014>.
- [38] Ding Y, Tan Y, Qu Z, Yu F. Renal microvascular lesions in lupus nephritis. *Ren Fail* 2020;42:19–29. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2019.1702057>.
- [39] Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medicine* 2008;358:929–39. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071297>.
- [40] Kaplan MJ. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:691–9. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.132>.
- [41] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (1979) 2004;303:1532–5. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- [42] Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells* 2020;9:915. <https://doi.org/10.3390/cells9040915>.
- [43] Vocanson M, Hennino A, Chavagnac C, Saint-Mezard P, Dubois B, Kaiserlian D, et al. Contribution of CD4 + and CD8 + T-cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol* 2005;1:75–86. <https://doi.org/10.1586/1744666x.1.1.75>.
- [44] JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins Part 1: Scientific Evidence Series on Testing and Assessment No.168 JT03321047. 2012.
- [45] Karlberg AT, Bergström MA, Börje A, Luthman K, Nilsson JLG. Allergic contact dermatitis - Formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers. *Chem Res Toxicol* 2008;21:53–69. <https://doi.org/10.1021/tx7002239>.
- [46] Jakasa I, Thyssen JP, Kezic S. The role of skin barrier in occupational contact dermatitis. *Exp Dermatol* 2018;27:909–14. <https://doi.org/10.1111/exd.13704>.

- [47] Bergström MA, Ott H, Carlsson A, Neis M, Zwadlo-Klarwasser G, Jonsson CAM, et al. A Skin-Like Cytochrome P450 Cocktail Activates Prohaptens to Contact Allergenic Metabolites. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;127:1145–53. <https://doi.org/10.1038/SJ.JID.5700638>.
- [48] Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al. Activation of the IL-1 $\beta$ -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;127:1956–63. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700819>.
- [49] Weber FC, Esser PR, Müller T, Ganesan J, Pellegatti P, Simon MM, et al. Lack of the purinergic receptor P2X7 results in resistance to contact hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:2609–19. <https://doi.org/10.1084/jem.20092489>.
- [50] Watanabe H, Gehrke S, Contassot E, Roques S, Tschopp J, Friedmann PS, et al. Danger Signaling through the Inflammasome Acts as a Master Switch between Tolerance and Sensitization. *The Journal of Immunology* 2008;180:5826–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5826>.
- [51] Martin SF, Esser PR, Weber FC, Jakob T, Freudenberg MA, Schmidt M, et al. Mechanisms of chemical-induced innate immunity in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2011;66:1152–63. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02652.x>.
- [52] Uruno A, Motohashi H. The Keap1-Nrf2 system as an in vivo sensor for electrophiles. *Nitric Oxide*, vol. 25, *Nitric Oxide*; 2011, p. 153–60. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.02.007>.
- [53] el Ali Z, Gerbeix C, Hemon P, Esser PR, Martin SF, Pallardy M, et al. Allergic Skin Inflammation Induced by Chemical Sensitizers Is Controlled by the Transcription Factor Nrf2 2013. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft084>.
- [54] Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009;64:1699–714. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02082.x>.
- [55] Byrne SN, Ullrich Atsushi Fukunaga SE, Khaskhely NM. Immune Response Cells, Play an Essential Role in Inducing an Dermal Dendritic Cells, and Not Langerhans. *J Immunol* 2008;180:3057–64. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3057>.
- [56] Helou DG, Martin SF, Pallardy M, Chollet-Martin S, Kerdine-Römer S. Nrf2 involvement in chemical-induced skin innate immunity. *Front Immunol* 2019;10:1004. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01004>.

- [57] Dhingra N, Shemer A, Correa Da Rosa J, Rozenblit M, Fuentes-Duculan J, Gittler JK, et al. Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2014;134:362–72. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.03.009>.
- [58] Minang JT, Areström I, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol* 2006;146:417–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03226.x>.
- [59] Bechara R, Antonios D, Azouri H, Pallardy M. Nickel Sulfate Promotes IL-17A Producing CD4+ T Cells by an IL-23-Dependent Mechanism Regulated by TLR4 and Jak-STAT Pathways. *Journal of Investigative Dermatology* 2017;137:2140–8. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.05.025>.
- [60] Brites GS, Ferreira I, Sebastião AI, Silva A, Carrascal M, Neves BM, et al. Allergic Contact Dermatitis: from pathophysiology to development of new preventive strategies. *Pharmacol Res* 2020:105282. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105282>.
- [61] Yabe R, Shimizu K, Shimizu S, Azechi S, Choi B II, Sudo K, et al. CCR8 regulates contact hypersensitivity by restricting cutaneous dendritic cell migration to the draining lymph nodes. *Int Immunol* 2015;27:169–81. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxu098>.
- [62] Veien NK. Systemic contact dermatitis. *Int J Dermatol* 2011;50:1445–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05104.x>.
- [63] Jensen CS, Menné T, Lisby S, Kristiansen J, Veien NK. Experimental systemic contact dermatitis from nickel: A dose-response study. *Contact Dermatitis* 2003;49:124–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2003.00157.x>.
- [64] Jensen CS, Lisby S, Larsen JK, Veien NK, Menne T. Characterization of lymphocyte subpopulations and cytokine profiles in peripheral blood of nickel-sensitive individuals with systemic contact dermatitis after oral nickel exposure. *Contact Dermatitis* 2004;50:31–8. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2004.00294.x>.
- [65] Aquino M, Rosner G. Systemic Contact Dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2019;56:9–18. <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8686-z>.
- [66] Tan CH, Rasool S, Johnston GA. Contact dermatitis: Allergic and irritant. *Clin Dermatol* 2014;32:116–24. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.033>.

- [67] Sarath Kumar KL, Tangadpalliwar SR, Desai A, Singh VK, Jere A. Integrated Computational Solution for Predicting Skin Sensitization Potential of Molecules. *PLoS One* 2016;11:e0155419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155419>.
- [68] Lepoittevin J-P. Development of structure^activity relationships (SARs) in allergic contact dermatitis. n.d.
- [69] Roberts DW, Patlewicz G, Kern PS, Gerberick F, Kimber I, Dearman RJ, et al. Mechanistic applicability domain classification of a local lymph node assay dataset for skin sensitization. *Chem Res Toxicol* 2007;20:1019–30. <https://doi.org/10.1021/tx700024w>.
- [70] Fotouhi L, Heravi MM, Zadsirjan V, Atoi PA. Electrochemically Induced Michael Addition Reaction: An Overview. *Chemical Record* 2018;18:1633–57. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800022>.
- [71] Aptula AO, Patlewicz G, Roberts DW. Skin sensitization: Reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1420–6. <https://doi.org/10.1021/tx050075m>.
- [72] Schultz TW, Rogers K, Aptula AO. Read-across to rank skin sensitization potential: subcategories for the Michael acceptor domain. *Contact Dermatitis* 2009;60:21–31. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0536.2008.01473.X>.
- [73] Roberts DW, Aptula AO, Patlewicz G. Electrophilic chemistry related to skin sensitization. Reaction mechanistic applicability domain classification for a published data set of 106 chemicals tested in the mouse local lymph node assay. *Chem Res Toxicol* 2007;20:44–60. <https://doi.org/10.1021/tx060121y>.
- [74] Landsteiner K, Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 1935;61:643–56. <https://doi.org/10.1084/jem.61.5.643>.
- [75] Roberts DW. Linear Free Energy Relationships for Reactions of Electrophilic Halo- and Pseudohalobenzenes, and Their Application in Prediction of Skin Sensitization Potential for SNAR Electrophiles. *Chem Res Toxicol* 1995;8:545–51. <https://doi.org/10.1021/tx00046a008>.
- [76] Hussain Z, Yousif E, Ahmed A, Altaie A. Synthesis and characterization of Schiff's bases of sulfamethoxazole. *Org Med Chem Lett* 2014;4:1. <https://doi.org/10.1186/2191-2858-4-1>.

- [77] Natsch A, Gfeller H, Haupt T, Brunner G. Chemical reactivity and skin sensitization potential for benzaldehydes: Can Schiff base formation explain everything? *Chem Res Toxicol* 2012;25:2203–15. <https://doi.org/10.1021/tx300278t>.
- [78] Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educacion Quimica* 2017;28:51–8. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>.
- [79] Technical Working Group On Pesticides (TWG). (Q)uantitative Structure Activity Relationship [(Q)SAR] Guidance Document 2012:1–186.
- [80] Kim JY, Kim MK, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Quantitative structure–activity and quantitative structure–property relationship approaches as alternative skin sensitization risk assessment methods. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 2019;82:447–72. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1616437>.
- [81] Dearden JC, Hewitt M, Roberts DW, Enoch SJ, Rowe PH, Przybylak KR, et al. Mechanism-Based QSAR Modeling of Skin Sensitization. *Chem Res Toxicol* 2015;28:1975–86. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00197>.
- [82] Roy K, Mitra I. Electrotopological State Atom (E-State) Index in Drug Design, QSAR, Property Prediction and Toxicity Assessment. *Current Computer Aided-Drug Design* 2012;8:135–58. <https://doi.org/10.2174/157340912800492366>.
- [83] Wang CC, Lin YC, Wang SS, Shih C, Lin YH, Tung CW. SkinSensDB: a curated database for skin sensitization assays. *J Cheminform* 2017;9:1–6. <https://doi.org/10.1186/s13321-017-0194-2>.
- [84] Montané E, Santesmases J. Adverse drug reactions. *Med Clin (Barc)* 2020;154:178–84. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2019.08.007>.
- [85] Torres Jaen MJ. *Alergológica* 2015. 2017.
- [86] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2010;141:1117–34. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.06.011>.
- [87] Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 2014;79:34–74. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2013.11.002>.
- [88] Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, et al. Trastuzumab Has Preferential Activity against Breast Cancers Driven by HER2 Homodimers. *Cancer Res* 2011;71:1871–82. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1872>.



- [89] Shi F, Telesco SE, Liu Y, Radhakrishnan R, Lemmon MA. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:7692–7. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1002753107>.
- [90] She Q-B, Solit D, Basso A, Moasser MM. Resistance to Gefitinib in PTEN-Null HER-Overexpressing Tumor Cells Can Be Overcome through Restoration of PTEN Function or Pharmacologic Modulation of Constitutive Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway Signaling 2003.
- [91] Sergina N V., Rausch M, Wang D, Blair J, Hann B, Shokat KM, et al. Escape from HER family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase inactive HER3. *Nature* 2007;445:437. <https://doi.org/10.1038/NATURE05474>.
- [92] Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res* 2003;23:3639–50.
- [93] Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011 12:2 2011;12:104–17. <https://doi.org/10.1038/nrm3048>.
- [94] Cáncer de pulmón - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 n.d. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/cancer-de-pulmon?start=1> (accessed December 9, 2021).
- [95] Herbst RS, Heymach J v., Lippman SM. Molecular origins of cancer: Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1367–80. <https://doi.org/10.1056/NEJMRA0802714>.
- [96] Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, M Austin JH, Beth Beasley M, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors 2015. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>.
- [97] López-Ríos F, Paz-Ares L, Sanz J, Isla D, Pijuan L, Felip E, et al. Actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores predictivos en el carcinoma de pulmón de célula no pequeña avanzado. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Revista Española de Patología* 2020;53:167–81. <https://doi.org/10.1016/J.PATOL.2019.11.004>.
- [98] Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* 2018;29:iv192–237. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDY275>.

- [99] Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol* 2020;27:27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>.
- [100] Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012 490:7418 2012;490:61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>.
- [101] Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007 26:45 2007;26:6469–87. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>.
- [102] Gillen S, Schuster T, Büschenfelde CM Zum, Friess H, Kleeff J. Preoperative/Neoadjuvant Therapy in Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Response and Resection Percentages. *PLoS Med* 2010;7:e1000267. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PMED.1000267>.
- [103] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549–54. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90571-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90571-5).
- [104] Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong SM, Yu J, Borges M, et al. Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Gastroenterology* 2012;142:730-733.e9. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.12.042>.
- [105] Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, et al. Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* 2003;11:305–9. <https://doi.org/10.3892/IJMM.11.3.305/HTML>.
- [106] Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology* 2007;25:1960–6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.07.9525>.
- [107] Wöll E, Devries A, Eisterer W, Hejna M, Keil F, Stein H, et al. Chemotherapy in Gastric Cancer. *Anticancer Res* 2008;28:1213–9. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-68328-5\\_32](https://doi.org/10.1007/978-4-431-68328-5_32).
- [108] Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0191>.

- [109] Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005;6:279–86. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70102-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70102-9).
- [110] Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clinical & Translational Oncology* 2021;23:913. <https://doi.org/10.1007/S12094-020-02533-1>.
- [111] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 2003 9:6 2003;9:669–76. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>.
- [112] Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Medicine* 1996 2:10 1996;2:1096–103. <https://doi.org/10.1038/nm1096-1096>.
- [113] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005 438:7069 2005;438:820–7. <https://doi.org/10.1038/nature04186>.
- [114] Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, de Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine* 2001 7:5 2001;7:575–83. <https://doi.org/10.1038/87904>.
- [115] Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:26988–95. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47116-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47116-5).
- [116] Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* 1999 5:6 1999;5:623–8. <https://doi.org/10.1038/9467>.
- [117] Permeability V, Endothelial F, Factor G, Hyperpermeability M, Harold A, Dvorak F, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029.
- [118] Mabeta P, Steenkamp V. The VEGF/VEGFR Axis Revisited: Implications for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 15585 2022;23:15585. <https://doi.org/10.3390/IJMS232415585>.

- [119] Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Is Mediated via the VEGF Receptor flt-1 n.d.
- [120] An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk Res* 2010;34:1255–68. <https://doi.org/10.1016/J.LEUKRES.2010.04.016>.
- [121] Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113:1619. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-03-144790>.
- [122] Rian B, Ruker JD, Oshe M, Alpaz T, Esta EJR, Eng IP, et al. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401> 2001;344:1031–7. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401>.
- [123] GELMC. Manual para el control y el tratamiento de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica. 5ª Edición. 2020.
- [124] Matsuda S, Ikeda Y, Murakami M, Nakagawa Y, Tsuji A, Kitagishi Y. Roles of PI3K/AKT/GSK3 Pathway Involved in Psychiatric Illnesses. *Diseases* 2019, Vol 7, Page 22 2019;7:22. <https://doi.org/10.3390/DISEASES7010022>.
- [125] Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature Reviews Clinical Oncology* 2018 15:5 2018;15:273–91. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28>.
- [126] Long HZ, Cheng Y, Zhou ZW, Luo HY, Wen DD, Gao LC. PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease. *Front Pharmacol* 2021;12:619. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.648636/BIBTEX>.
- [127] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017;168:960–76. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.02.004>.
- [128] Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic 2004.
- [129] O’Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, et al. mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2925>.
- [130] Brown JS, O’Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov* 2017;7:20. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0860>.

- [131] Beck C, Robert I, Reina-San-Martin B, Schreiber V, Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp Cell Res* 2014;329:18–25. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2014.07.003>.
- [132] Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery* 2020 19:10 2020;19:711–36. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0076-6>.
- [133] Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN, Helleday T. Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks. *Mol Cell Biol* 2005;25:7158. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7158-7169.2005>.
- [134] Venkitaraman AR. Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 2001;114:3591–8. <https://doi.org/10.1242/JCS.114.20.3591>.
- [135] Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade MA, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1427–38. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.1427.3.11>.
- [136] Spring LM, Wander SA, Andre F, Moy B, Turner NC, Bardia A. Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors for hormone receptor-positive breast cancer: past, present, and future. *The Lancet* 2020;395:817–27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30165-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30165-3).
- [137] Thangavel C, Dean JL, Ertel A, Knudsen KE, Aldaz CM, Witkiewicz AK, et al. Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:333–45. <https://doi.org/10.1530/ERC-10-0262>.
- [138] Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 2001 411:6841 2001;411:1017–21. <https://doi.org/10.1038/35082500>.
- [139] Yu Q, Sicinska E, Geng Y, Ahnström M, Zagodzón A, Kong Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer Cell* 2006;9:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.12.012>.
- [140] Finn RS, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen DJ, Desai AJ, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research* 2009;11:1–13. <https://doi.org/10.1186/BCR2419/FIGURES/6>.

- [141] Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC, Knudsen ES. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:130. <https://doi.org/10.1038/NRD4504>.
- [142] Zelnak AB. Clinical pharmacology and use of microtubule-targeting agents in cancer therapy. *Methods Mol Med* 2007;137:209–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-442-1\\_15/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-442-1_15/COVER).
- [143] Steed H, Sawyer MB. Pharmacology, pharmacokinetics and pharmacogenomics of paclitaxel. <Http://DxDoiOrg/102217/1462241687803> 2007;8:803–15. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.7.803>.
- [144] Kim YN, Kim JY, Kim JW, Kim JH, Kim HI, Yune S, et al. The Hidden Culprit: A Case of Repeated Anaphylaxis to Cremophor. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016;8:174. <https://doi.org/10.4168/AAIR.2016.8.2.174>.
- [145] Dimitrov SD, Diderich R, Sobanski T, Pavlov TS, Chankov G v., Chapkanov AS, et al. QSAR Toolbox – workflow and major functionalities. <Http://DxDoiOrg/101080/1062936X20151136680> 2016;27:203–19. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1136680>.
- [146] The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins 2014. <https://doi.org/10.1787/9789264221444-EN>.
- [147] Kozuki T. Skin problems and EGFR-tyrosine kinase inhibitor. *Jpn J Clin Oncol* 2016;46:291–8. <https://doi.org/10.1093/JJCO/HYV207>.
- [148] de Tursi M, Zilli M, Carella C, Auriemma M, Lisco MN, di Nicola M, et al. Skin toxicity evaluation in patients treated with cetuximab for metastatic colorectal cancer: a new tool for more accurate comprehension of quality of life impacts. *Onco Targets Ther* 2017;10:3007–15. <https://doi.org/10.2147/OTT.S127795>.
- [149] OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS DRAFT PROPOSAL FOR A NEW TEST GUIDELINE In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 2014.
- [150] Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation 2018. <https://doi.org/10.1787/9789264264359-EN>.
- [151] Zhao Y, Cheng B, Chen Z, Li J, Liang H, Chen Y, et al. Toxicity profile of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for patients with lung cancer: A systematic review and network meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2021;160:103305. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2021.103305>.

- [152] Wacker B, Nagrani T, Weinberg J, Witt K, Clark G, Cagnoni PJ. Correlation between Development of Rash and Efficacy in Patients Treated with the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Erlotinib in Two Large Phase III Studies. *Clinical Cancer Research* 2007;13:3913–21. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2610>.
- [153] Peeters M, Siena S, van Cutsem E, Sobrero A, Hendlitz A, Cascinu S, et al. Association of progression-free survival, overall survival, and patient-reported outcomes by skin toxicity and KRAS status in patients receiving panitumumab monotherapy. *Cancer* 2009;115:1544–54. <https://doi.org/10.1002/CNCR.24088>.
- [154] Brahmer JR, Lee JW, Traynor AM, Hidalgo MM, Kolesar JM, Siegfried JM, et al. Dosing to rash: A phase II trial of the first-line erlotinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E3503). *Eur J Cancer* 2014;50:302–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.10.006>.
- [155] Mascia F, Lam G, Keith C, Garber C, Steinberg SM, Kohn E, et al. Genetic ablation of epidermal EGFR reveals the dynamic origin of adverse effects of anti-EGFR therapy. *Sci Transl Med* 2013;5:199ra110. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3005773>.
- [156] Steffens M, Paul T, Hichert V, Scholl C, von Mallek D, Stelzer C, et al. Dosing to rash? - The role of erlotinib metabolic ratio from patient serum in the search of predictive biomarkers for EGFR inhibitor-mediated skin rash. *Eur J Cancer* 2016;55:131–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.022>.
- [157] Nishimura M, Hayashi M, Mizutani Y, Takenaka K, Imamura Y, Chayahara N, et al. Distribution of erlotinib in rash and normal skin in cancer patients receiving erlotinib visualized by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Oncotarget* 2018;9:18540–7. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.24928>.
- [158] Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* 2007;356:115–24. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA065044/SUPPL\\_FILE/NEJM\\_MOTZER\\_115SA1.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA065044/SUPPL_FILE/NEJM_MOTZER_115SA1.PDF).
- [159] Massey PR, Okman JS, Wilkerson J, Cowen EW. Tyrosine kinase inhibitors directed against the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) have distinct cutaneous toxicity profiles: A meta-analysis and review of the literature. *Support Care Cancer* 2015;23:1827. <https://doi.org/10.1007/S00520-014-2520-9>.
- [160] Hasan Alshammari A, Masuo Y, Fujita K ichi, Shimada K, Iida N, Wakayama T, et al. Discrimination of hand-foot skin reaction caused by tyrosine kinase inhibitors based on direct keratinocyte toxicity and vascular endothelial growth factor receptor-2

- inhibition. *Biochem Pharmacol* 2022;197:114914. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2022.114914>.
- [161] Chanprapaph K, Rutnin S, Vachiramon V. Multikinase Inhibitor-Induced Hand–Foot Skin Reaction: A Review of Clinical Presentation, Pathogenesis, and Management. *Am J Clin Dermatol* 2016;17:387–402. <https://doi.org/10.1007/S40257-016-0197-1>.
- [162] Lipworth AD, Robert C, Zhu AX. Hand-foot syndrome (hand-foot skin reaction, palmar-plantar erythrodysesthesia): Focus on sorafenib and sunitinib. *Oncology* 2009;77:257–71. <https://doi.org/10.1159/000258880>.
- [163] Azad NS, Aragon-Ching JB, Dahut WL, Gutierrez M, Figg WD, Jain L, et al. Hand-foot skin reaction increases with cumulative sorafenib dose and with combination anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1411–6. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1141>.
- [164] Zhu Y, Zhang X, Lou X, Chen M, Luo P, He Q. Vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody significantly increases the risk of hand-foot skin reaction to multikinase inhibitors (MKIs): A systematic literature review and meta-analysis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2018;45:659–67. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12935>.
- [165] Registration Dossier - ECHA n.d. <https://echa.europa.eu/en/registration-dossier/-/registered-dossier/6884/7/5/2> (accessed February 19, 2023).
- [166] Fujita K ichi, Masuo Y, Yamazaki E, Shibutani T, Kubota Y, Nakamichi N, et al. Involvement of the Transporters P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein in Dermal Distribution of the Multikinase Inhibitor Regorafenib and Its Active Metabolites. *J Pharm Sci* 2017;106:2632–41. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.064>.
- [167] Amitay-Laish I, Stemmer SM, Lacouture ME. Adverse cutaneous reactions secondary to tyrosine kinase inhibitors including imatinib mesylate, nilotinib, and dasatinib. *Dermatol Ther* 2011;24:386–95. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8019.2011.01431.X>.
- [168] Drummond A, Micallef-Eynaud P, Douglas WS, Murphy JA, Hay I, Holyoake TL, et al. A spectrum of skin reactions caused by the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate (sti 571, glivec®). *Br J Haematol* 2003;120:911–3. [https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2003.04151\\_4.X](https://doi.org/10.1046/J.1365-2141.2003.04151_4.X).
- [169] Novitzky-Basso I, Craddock C. Cross-intolerance to imatinib, dasatinib and nilotinib therapy in a patient with chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2011;86:548–9. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.2011.01603.X>.



- [170] Breccia M, Carmosino I, Russo E, Morano SG, Latagliata R, Alimena G. Early and tardive skin adverse events in chronic myeloid leukaemia patients treated with imatinib. *Eur J Haematol* 2005;74:121–3. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0609.2004.00351.X>.
- [171] Leitão JR, Valente NYS, Kakizaki P, Veronez IS, Pires MC. Lichen planopilaris-like eruption during treatment with tyrosine kinase inhibitor nilotinib. *An Bras Dermatol* 2016;91:45. <https://doi.org/10.1590/ABD1806-4841.20164724>.
- [172] Lerch M, Mainetti C, Terziroli Beretta-Piccoli B, Harr T. Current Perspectives on Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 2017 54:1 2017;54:147–76. <https://doi.org/10.1007/S12016-017-8654-Z>.
- [173] French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens Johnson syndrome: Our current understanding. *Allergology International* 2006;55:9–16. <https://doi.org/10.2332/ALLERGOLINT.55.9>.
- [174] Axéll T. Hypersensitivity of the oral mucosa: clinics and pathology. [Http://DxDoiOrg/101080/000163501750541192](http://DxDoiOrg/101080/000163501750541192) 2009;59:315–9. <https://doi.org/10.1080/000163501750541192>.
- [175] José Segura Egea J, Bullón Fernández P, Segura Egea JJ. Reacción liquenoide oral en relación con una restauración de amalgama de plata. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Ed Impresa)* 2004;9:421–4.
- [176] Musolino C, Allegra A, Mannucci C, Russo S, Alonci A, Maisano V, et al. Possible Role of Interleukin-31/33 Axis in Imatinib Mesylate-Associated Skin Toxicity. *Turkish Journal of Hematology* 2015;32:168. <https://doi.org/10.4274/TJH.2014.0021>.
- [177] Cornelissen C, Brans R, Czaja K, Skazik C, Marquardt Y, Zwadlo-Klarwasser G, et al. Ultraviolet B radiation and reactive oxygen species modulate interleukin-31 expression in T lymphocytes, monocytes and dendritic cells. *British Journal of Dermatology* 2011;165:966–75. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2133.2011.10487.X>.
- [178] Poveda A, Floquet A, Ledermann JA, Asher R, Penson RT, Oza AM, et al. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021;22:620–31. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00073-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00073-5).
- [179] Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation . *New England Journal of Medicine* 2017;377:523–33.

- [https://doi.org/10.1056/NEJMOA1706450/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1706450\\_DISCLOSURES.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1706450/SUPPL_FILE/NEJMOA1706450_DISCLOSURES.PDF).
- [180] Huynh Dagher S, Blom A, Chabanol H, Funck-Brentano E. Cutaneous toxicities from targeted therapies used in oncology: Literature review of clinical presentation and management. *Int J Womens Dermatol* 2021;7:615. <https://doi.org/10.1016/J.IJWD.2021.09.009>.
- [181] Chiu LY, Wu NL, Hung CF, Bai P, Dai YS, Lin WW. PARP-1 involves in UVB-induced inflammatory response in keratinocytes and skin injury via regulation of ROS-dependent EGFR transactivation and p38 signaling. *FASEB Journal* 2021;35. <https://doi.org/10.1096/FJ.202002285RR>.
- [182] André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA -Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer . *New England Journal of Medicine* 2019;380:1929–40. [https://doi.org/10.1056/NEJMOA1813904/SUPPL\\_FILE/NEJMOA1813904\\_DATA-SHARING.PDF](https://doi.org/10.1056/NEJMOA1813904/SUPPL_FILE/NEJMOA1813904_DATA-SHARING.PDF).
- [183] Royer B, Kaderbhai CG, Schmitt A. Pharmacokinetics and Pharmacodynamic of Alpelisib. *Clin Pharmacokinet* 2023;62:45–53. <https://doi.org/10.1007/S40262-022-01195-2/TABLES/3>.
- [184] Huijts CM, Santegoets SJ, de Jong TD, Verheul HM, de Gruijl TD, van der Vliet HJ. Immunological effects of everolimus in patients with metastatic renal cell cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2017;30:341. <https://doi.org/10.1177/0394632017734459>.
- [185] Cao W, Manicassamy S, Tang H, Kasturi SP, Pirani A, Murthy N, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nature Immunology* 2008 9:10 2008;9:1157–64. <https://doi.org/10.1038/ni.1645>.
- [186] Gomez-Fernandez C, Garden BC, Wu S, Feldman DR, Lacouture ME. The risk of skin rash and stomatitis with the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2012;48:340–6. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2011.11.028>.
- [187] Spring LM, Wander SA, Andre F, Moy B, Turner NC, Bardia A. Cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitors for hormone receptor-positive breast cancer: past, present, and future. *The Lancet* 2020;395:817–27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30165-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30165-3).

- [188] Raschi E, Fusaroli M, la Placa M, Ardizzoni A, Zamagni C, Poluzzi E, et al. Skin Toxicities with Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitors in Breast Cancer: Signals from Disproportionality Analysis of the FDA Adverse Event Reporting System. *Am J Clin Dermatol* 2022;23:247–55. <https://doi.org/10.1007/S40257-021-00645-0/TABLES/3>.
- [189] Picard M, Castells MC. Re-visiting Hypersensitivity Reactions to Taxanes: A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2015;49:177–91. <https://doi.org/10.1007/S12016-014-8416-0/FIGURES/3>.
- [190] Bourdenet V, Jaulent C, Hacard F, Berard F, Nicolas JF, Vocanson M, et al. Molecular analysis of an intradermal skin test to establish the diagnosis of delayed allergy to paclitaxel. *Contact Dermatitis* 2021;85:265–6. <https://doi.org/10.1111/COD.13854>.



# 8. ABREVIATURAS



Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARH3	ADP-ribosilhidrolasa3
BA	Benzaldehido
CPA	Célula presentadora de antígenos
CPCNP	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña
DAMP	Patrones asociados a daño molecular
DEGs	Genes tempranos retardados
DEPTOR	DEP domain containing mTOR
DNCB	Dinitroclorobenceno
DPRA	Direct Peptide Reactivity Assay
DUSPs	Fosfatasas duales específicas
EGFR	"Endotelial grow factor receptor"
EPP	Eritrodiesia palmoplantar
EpRE	Elementos de respuesta electrófila

Fc	Fracción constante epsilon receptor R1
FcεRI	Fracción constante epsilon receptor R1
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HR	Receptor hormonal
HRR	Reparación por recombinación homóloga
IAR	Índice de alquilación relativa
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IECA	Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IEGs	Genes tempranos inmediatos
IRS	Receptor sustrato de insulina
IS	Índice de estimulación
ITAM	Inmunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITK	Inhibidor de tirosina quinasa
JAK	Janus quinasa
KDR	Kinase domain region
LES	Lupus eritematoso sistémico



LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLNA	Ensayo del nódulo linfático local
LMC	Leucemia mieloide crónica
MAC	Complejo de ataque a la membrana
mARN	ARN mensajero
MEST	Test de engrosamiento de oreja
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miARN	ARN mitocondrial
NL	Nódulo linfático
NO	Óxido nítrico
PAF	Factor activador de plaquetas
PARG	poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF	Punto de fusión
PGI2	Prostaciclina
PIK3	Fosfoinosiol 3 quinasa
PIP3	Fosfatidil inosil trifosfato

PLGF	Factor de crecimiento placentario
PTEN	Proteína supresora de tumores
QSAR	Relación cuantitativa estructura actividad
RAGE	Receptor de glicación avanzada
RAI	Relative Alkilation Index
RAM	Reacción adversas medicamentosa
Raptor	Regulatory protein associated with Mtor
RB1	Proteina supresora de tumores de r retinoblastoma
RI	Receptor R1
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor tirosina quinasa
SAR	Relación estructura activida
SEAP	Sociedad española de anatomia patológica
SEOM	Sociedad española de oncología médica
SN	Sustitución nucleofílica
SnAr	Sustitución nucleofílica aromática
SSB	Rotura de cadena doble

SSJ	Síndrome de Stevens-Johnson
TCR	Receptor de linfocito T
TK	Tirosin quinasa
TLR	"Toll like receptor"
TN	Triple negativo
TNCB	2,4,6-trinitroclorobenceno
t-PA	Factor tisular activador de plasminógeno
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VEGFR	"Vascular endotelial grow factor receptor"



# 9. ANEXOS



## **ANEXO I:**

Publicación científica:

“Evaluación in vitro de las reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado a los antineoplásicos”





Article

# Evaluation of Antineoplastic Delayed-Type Hypersensitivity Skin Reactions In Vitro

Inés Roger <sup>1,2,\*</sup>, Paula Montero <sup>2,\*</sup>, Antonio García <sup>2,3</sup>, Javier Milara <sup>1,2,4</sup>, Pilar Ribera <sup>2</sup>, Jose Alejandro Pérez-Fidalgo <sup>5,6,7</sup> and Julio Cortijo <sup>1,2,8</sup>

- <sup>1</sup> Biomedical Research Networking Centre on Respiratory Diseases (CIBERS), Health Institute Carlos III, 28029 Madrid, Spain
  - <sup>2</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, 46100 Valencia, Spain
  - <sup>3</sup> Pharmacy Unit, University Clinic Hospital, 46010 Valencia, Spain
  - <sup>4</sup> Pharmacy Unit, University General Hospital Consortium, 46014 Valencia, Spain
  - <sup>5</sup> Department of Medical Oncology, University Clinic Hospital of Valencia, 46010 Valencia, Spain
  - <sup>6</sup> Biomedical Research Networking Centre on Cancer (CIBERONC), Health Institute Carlos III, 28029 Madrid, Spain
  - <sup>7</sup> INCI.IVA Biomedical Research Institute, 46010 Valencia, Spain
  - <sup>8</sup> Research and Teaching Unit, University General Hospital Consortium, 46014 Valencia, Spain
- \* Correspondence: irola3@gmail.com (I.R.); paulamonmag@gmail.com (P.M.); Tel.: +34-963864631 (I.R.)  
 † These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Delayed-type hypersensitivity (DTH) is caused by a broad number of drugs used in clinic, and antineoplastic drugs show an elevated proportion of DTH, which potentially affects the quality of life of patients. Despite the serious problem and the negative economic impact deriving from market withdrawal of such drugs and high hospitalization costs, nowadays, there are no standard validated methods in vitro or in vivo to evaluate the sensitizing potential of drugs in the preclinical phase. Enhanced predictions in preclinical safety evaluations are really important, and for that reason, the aim of our work is to adapt in vitro DPRA, ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™, and hCLAT assays for the study of the sensitizing potential of antineoplastic agents grouped by mechanism of action. Our results reveal that the above tests are in vitro techniques able to predict the sensitizing potential of the tested antineoplastics. Moreover, this is the first time that the inhibition of the VEGFR1 pathway has been identified as a potential trigger of DTH.

**Keywords:** antineoplastic; DPRA; hCLAT; KeratinoSens™; delayed-type hypersensitivity (DTH)



**Citation:** Roger, I.; Montero, P.; García, A.; Milara, J.; Ribera, P.; Pérez-Fidalgo, J.A.; Cortijo, J. Evaluation of Antineoplastic Delayed-Type Hypersensitivity Skin Reactions In Vitro. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1111. <https://doi.org/10.3390/ph15091111>

Academic Editor: Giorgio Cozza

Received: 1 August 2022

Accepted: 29 August 2022

Published: 6 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Delayed-type hypersensitivity (DTH) is caused by a broad number of drugs used in clinics [1], and antineoplastic drugs show an elevated proportion of DTH, which potentially affects the quality of life of patients [2–4]. The vague or inconsistent terminology used to describe these reactions may reflect our poor understanding of their pathophysiology, which can vary for different agents. Although severe hypersensitivity reactions are rare, the incidence of mild-to-moderate reactions may be underestimated in the oncology community [5]. Currently, there is no evidence on whether DTH is produced by a particular antineoplastic drug family or mechanism of action, and it has not been formally tested in a DTH predictive assay to evaluate whether there is a chemical drug condition or biological process. In this regard, it would be of potential value to arrange a simple and reliable in vitro test to predict the DTH in both preclinical development and clinical practice.

Skin sensitizers are substances capable of causing DTH, a local skin reaction characterized by redness, swelling, and itching [6]. Reactions vary in severity from self-limiting maculopapular eruptions to life-threatening Stevens–Johnson Syndrome/toxic epidermal necrolysis. Skin sensitization develops in two stages: induction and elicitation. In the induction phase, allergen-specific T cells are generated, a process that typically does not

produce clinical symptoms. The elicitation phase and accompanying allergic response occur when a previously sensitized individual is re-exposed to the inducing allergen [7].

DTH reactions to systemically administered drugs are also a safety concern that cannot be revealed by standard toxicity studies [8]. The cells involved and mediators released during the different phases of hypersensitivity reactions can be assessed using in vitro and in vivo tests [9]. However, nowadays, there are no valid in vivo or in vitro methods for assessing the sensitizing potential of a drug during the preclinical phase, despite the important adverse effects induced and directly linked to immune-mediated hypersensitivity and autoimmunity reactions.

The OECD Test Guideline [10–12] describes in vitro assays that address mechanisms described under key biological events of the Adverse Outcome Pathway (AOP) [13]. These test methods support the discrimination between skin sensitizers and nonsensitizers by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [14]. The test methods currently described in this Guideline are direct peptide reactivity assay (DPRA), ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ assay, and the human cell line activation test (hCLAT) [15–18]. The principle of these methods is based on the fact that in the sensitization phase, antigen-specific T cells are generated. Data suggest that pharmaceuticals may share a common mechanism of action with chemical allergens, a fact that supports the possibility to use these in vitro methods for the identification of drugs potentially associated with hypersensitivity reactions [19]. Therefore, this study aims to adapt an in vitro test for DTH to predict the skin sensitizing potential of different antineoplastics. In addition, we investigated whether there is a specific mechanism of action of antineoplastics to produce DTH.

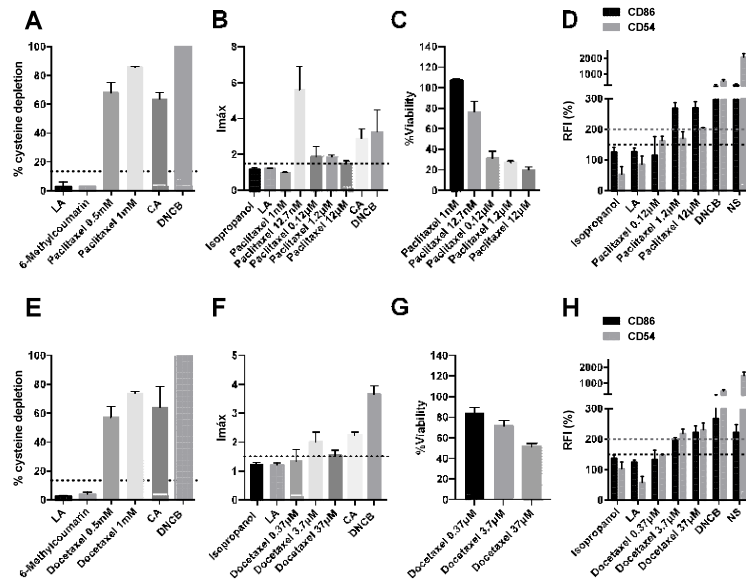
## 2. Results

### 2.1. Taxanes Induce Delayed-Type Hypersensitivity

The sensitizing potential of the antimicrotubule agents, paclitaxel and docetaxel, was analyzed. The molecular initiating event is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centers in skin proteins. Paclitaxel and docetaxel were found to have moderate reactivity in DPRA with 85.55 ± 0.74% and 73.55 ± 2.09% cysteine depletion, respectively (Figure 1A,E).

The second key event in DTH is the elicitation of an inflammatory response in the keratinocytes. The proinflammatory potential of VEGF inhibitors was tested in keratinocytes according to the OECD Guidelines [11]. Both drugs were able to elicit inflammatory events in keratinocytes. The I<sub>max</sub> of paclitaxel at 12.7 nM was 5.59 ± 1.83 (Figure 1B). At higher concentrations, I<sub>max</sub> decreased as cell viability decreased to 31.4 ± 9.2 (Figure 1C). The I<sub>max</sub> of docetaxel at 3.7 μM was 2.011 ± 0.47 (Figure 1F). As in the previous case, the higher dose has a lower I<sub>max</sub> as viability decreases (Figure 1G).

Finally, the third key event in DHT is the activation of dendritic cells, typically assessed by the expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines [12]. The antineoplastic also caused a significant increase in CD86 and CD54 expression in hCLAT (Figure 1D,H). The feasibility of the results was checked by appropriate controls. 6-methyl coumarin and lactic acid (LA) were used as negative controls, and cinnamic aldehyde (CA) and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) were used as positive controls in the DPRA assay. Isopropanol and LA were used as negative controls, and CA and DNCB were used as positive controls in the KeratinoSens™ assay. And in hCLAT, isopropanol and LA were used as negative controls, and DNCB and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. The final classification, based on a “2 out of 3” model, predicts that paclitaxel and docetaxel are positive, so they produce skin sensitization (Table 1).



**Figure 1.** Analysis of delayed-type hypersensitivity of paclitaxel and docetaxel by direct peptide reactivity assay (DPRA), KeratinoSens™ assay, and human cell line activation test (hCLAT). (A) DPRA analysis 24 after incubation with paclitaxel. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (B) KeratinoSens™ analysis after 48 h of incubation with paclitaxel. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (C) % of viability after 48 h of incubation with paclitaxel. (D) Human cell line activation test (hCLAT) analysis after 48 h of incubation with paclitaxel. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. (E) DPRA analysis 24 h after incubation with docetaxel. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (F) KeratinoSens™ analysis after 48 h of incubation with docetaxel. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (G) % of viability after 48 h of incubation with docetaxel. (H) hCLAT analysis 48 h of incubation with docetaxel. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. Lactic acid (LA), 6-Methylcoumarin, and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean ± SEM (n = 3). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.

**Table 1.** Classification results for antineoplastics.

Drug	DPRA	KeratinoSens™	hCLAT	Classification
Sunitinib	+	-*	+	Positive
Regorafenib	+	-*	+	Positive
Sorafenib	+	-*	+	Positive
Bevacizumab	-	-	+	Positive
Olaparib	+	-	-	Negative
Palbociclib	-	-	+	Negative
Paclitaxel	+	+	+	Positive
Docetaxel	+	+	+	Positive
Imatinib	Inconclusive (Coelution)	+	+	Positive

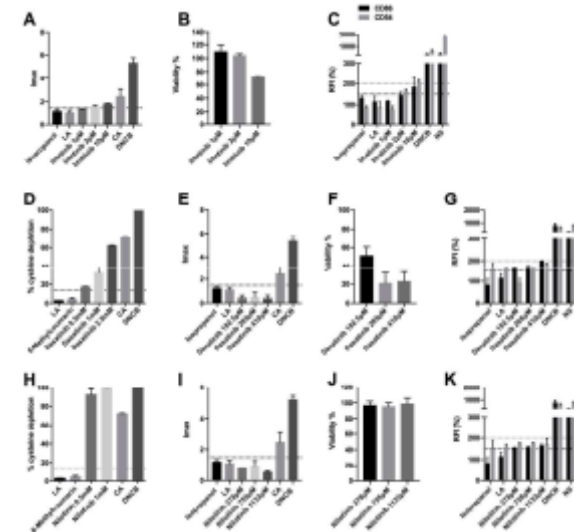
**Table 1.** Cont.

Drug	DPRA	KeratinoSens™	hCLAT	Classification
Nilotinib	+	-	+	Positive
Dasatinib	+	-*	+	Positive

\* The viability is below 70%, and therefore the drug is considered cytotoxic.

**2.2. BCR-ABL, C-KIT, and PDGF Inhibitors Induce Delayed-Type Hypersensitivity**

Imatinib, dasatinib, and nilotinib are tyrosine kinase inhibitors that target the BCR-ABL, c-kit, and PDGF (platelet-derived growth factor) receptors. The DPRA reactivity of imatinib was not determined due to its coelution with the cysteine peptide, and the calculation of the percent of peptide depletion was reported as inconclusive. In the case of dasatinib, the cysteine depletion percentages were  $17.34 \pm 0.39$ ,  $32.3 \pm 10.03$ , and  $62.13 \pm 0.60$  for the 0.5 mM, 1 mM, and 2.5 mM concentrations, respectively (Figure 2D). Nilotinib produced high reactivity ( $99.5 \pm 0.59\%$  peptide decrease) at 1mM and moderate reactivity ( $99.5 \pm 9.29\%$  peptide decrease) at 0.5 mM (Figure 2H). Therefore, they are considered positive for DPRA. In addition, only imatinib was able to elicit inflammatory events in keratinocytes. The Imax of imatinib at 10 μM was  $1.85 \pm 0.06$  (Figure 2A), and the viability, in all concentrations, was higher than 70% (Figure 2B). However, neither of the other two agents are positive as they have an Imax lower than 1.5 (Figure 2E,I). The viability of dasatinib, in all concentrations, was lower than 70%, so the drug is considered cytotoxic (Figure 2J). Finally, all three drugs cause the activation of dendritic cells. Specifically, imatinib causes an increase in CD86 and CD54 expression (Figure 2C), and dasatinib and nilotinib cause an increase only in CD86 (Figure 2G,K). Therefore, the final classification, based on a “2 out of 3” predicts that imatinib, dasatinib, and nilotinib are positive, so, they produce skin sensitization (Table 1).



**Figure 2.** Analysis of delayed-type hypersensitivity of imatinib, dasatinib, and nilotinib by direct peptide reactivity assay (DPRA), KeratinoSens™ assay, and human cell line activation test (hCLAT).

(A) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with imatinib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (B) % of viability after 48 h of incubation with imatinib. (C) hCLAT analysis after 48 h of incubation with imatinib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. (D) DPRA analysis 24 h after incubation with dasatinib. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (E) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with dasatinib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (F) % of viability after 48 h of incubation with dasatinib. (G) hCLAT analysis after 48 h of incubation with dasatinib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. (H) DPRA analysis 24 h after incubation with nilotinib. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (I) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with nilotinib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (J) % of viability after 48 h of incubation with nilotinib. (K) hCLAT analysis after 48 h of incubation with nilotinib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. Lactic acid (LA), 6-Methylcoumarin, and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.

### 2.3. Olaparib and Palbociclib Do Not Induce Delayed-Type Hypersensitivity

The sensitizing potential of olaparib and palbociclib was also studied. Olaparib showed low reactivity at 1 mM (with a % cysteine depletion of 21.21%) and moderate reactivity at 2.5 mM (with a % cysteine depletion of 56.89%) (Figure 3A). It was therefore considered positive for the DPRA technique. In the case of palbociclib, it did not produce a percentage of cysteine depletion greater than 13.89% and is thus considered negative (Figure 3E). In the second key event, both olaparib and palbociclib were negative since neither activated the Nrf2 pathway ( $Imax < 1.5$ ) with a viability greater than 70% (Figure 3B,C,E,G). Olaparib also did not increase the expression of the CD86 and CD54 expression by more than 150% and 200%, respectively (Figure 3D). However, palbociclib increased CD86 expression by more than 150% (Figure 3I). Therefore, the final classification, based on a “2 out of 3”, predicts that olaparib and palbociclib are negative and do not produce skin sensitization (Table 1).

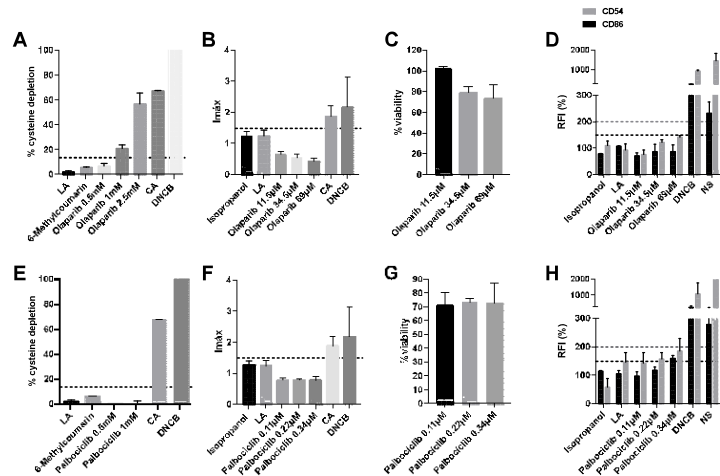


Figure 3. Analysis of delayed-type hypersensitivity of olaparib and palbociclib by direct peptide reactivity assay (DPRA), KeratinoSens<sup>TM</sup> assay, and human cell line activation test (hCLAT). (A) DPRA

analysis 24 after incubation with olaparib. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (B) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (C) % of viability after 48 h of incubation with. (D) hCLAT analysis after 48 h of incubation with olaparib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. (E) DPRA analysis 24 h after incubation with palbociclib 0.5 mM, 1 mM. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (F) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with palbociclib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (G) % of viability after 48 h of incubation with palbociclib. (H) hCLAT analysis 48 h of incubation with palbociclib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. Lactic acid (LA), 6-Methylcoumarin, and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.

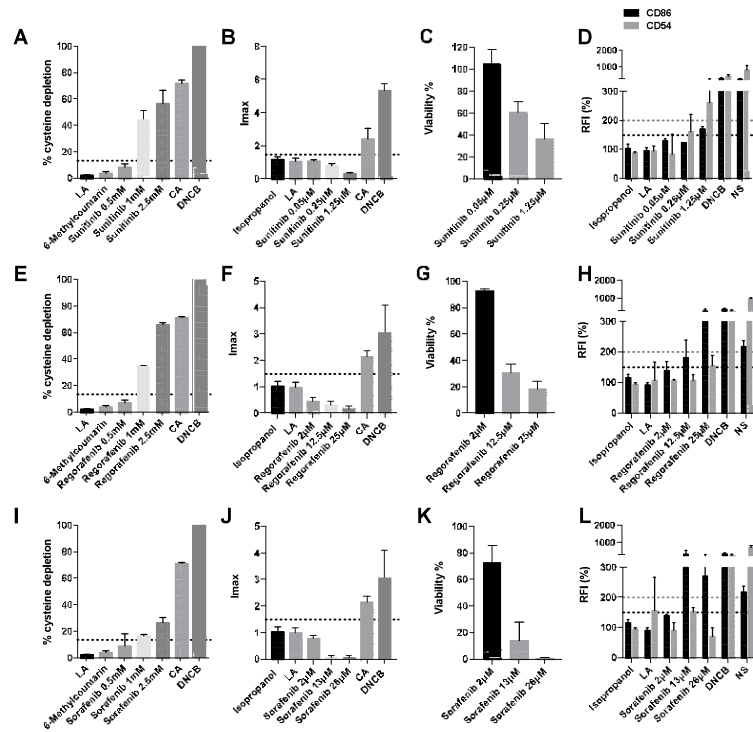
### 2.4. Vegf Inhibitors Induce Delayed-Type Hypersensitivity

The sensitizing potential of vascular endothelial growth factor (VEGF)-coupled tyrosine kinase inhibitors, sunitinib, regorafenib, and sorafenib, as well as the monoclonal antibody against VEGF bevacizumab, were analyzed. Moderate cysteine depletion was noticed at the two highest concentrations of sunitinib and regorafenib (1 mM and 2.5 mM) (Figure 4A,E). Sorafenib showed moderate cysteine depletion at the 2.5 mM concentration and low depletion at 1 mM (Figure 4I). Therefore, all of them are considered positive for the DPRA assay. However, by DPRA, it was not possible to evaluate the binding of bevacizumab to cysteine since the DPRA technique is designed for small molecules. However, none of the concentrations of sunitinib, regorafenib, and sorafenib activated the Nrf2 pathway as they had an  $Imax$  lower than 1.5 (Figure 4B,F,J). Surely, these compounds did not produce the activation of Nrf2 because at the two highest plasmatic concentrations they decreased cell viability below 50%, thus considered cytotoxic (Figure 4C,G,K). On the other hand, bevacizumab activated the Nrf2 pathway with an  $Imax$  of  $1.82 \pm 0.29$ , and its viability did not drop below 70% at any of the assayed concentrations (Figure 5A,B).

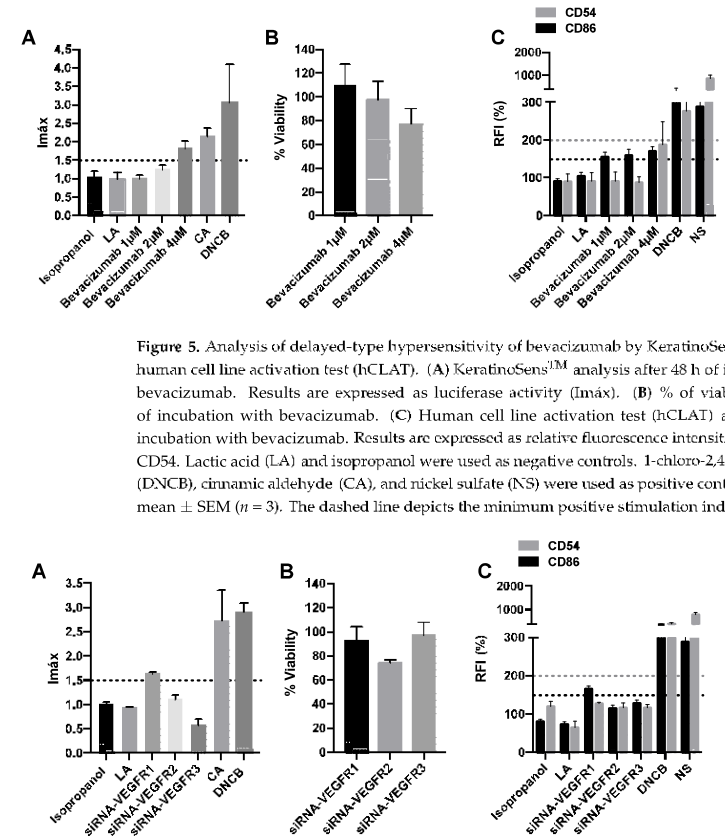
Finally, concerning the expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines, sunitinib caused an increase of 150% or 200% in relative fluorescence intensity (RFI) of CD86 and CD54, respectively, and therefore was considered positive for both CD86 and CD54 expression (Figure 4D). Regorafenib, sorafenib, and bevacizumab only caused an increase of 150% in RFI of CD86 and therefore were considered positive only for CD86 expression (Figure 4H,L and Figure 5C). Table 1 summarizes the results obtained in the three techniques as well as the final classification based on a “2 out of 3” approach. Out of four VEGF inhibitors tested, all four were positive for h-CLAT and DPRA but not for KeratinoSens<sup>TM</sup> indicating that they did not elicit a proinflammatory response but did prompt the activation of the third key event.

### 2.5. siRNA-VEGFR1 Induces Delayed-Type Hypersensitivity

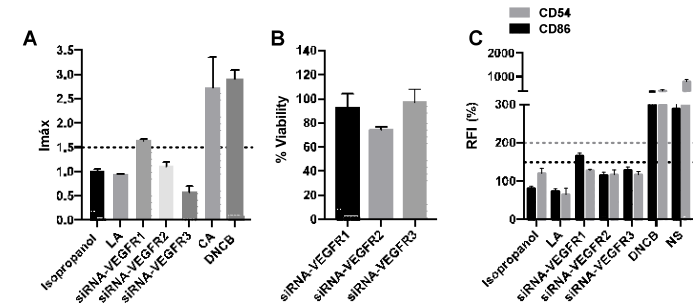
To determine whether there is any relevant mechanism of action in the development of DTH, and because all four VEGFR inhibitors, regardless of their nature, have been positive, we decided to silence the three VEGFR receptors, VEGFR1, VEGFR2, and VEGFR3. Using KeratinoSens<sup>TM</sup>, we observed that siRNA-VEGFR1 activated the Nrf2 pathway, with an  $Imax$  greater than 1.5 (Figure 6A) and a viability close to 100% (Figure 6B). Similarly, the only silencing that caused an increase in CD86 expression greater than 150 was siRNA-VEGFR1 (Figure 6C). Therefore, we could conclude that the inhibition of the VEGFR1 pathway is capable of inducing DTH.



**Figure 4.** Analysis of delayed-type hypersensitivity of sunitinib, regorafenib, and sorafenib by direct peptide reactivity assay (DPRA), KeratinoSens<sup>TM</sup> assay, and human cell line activation test (hCLAT). (A) DPRA analysis 24 h after incubation with sunitinib. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (B) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with sunitinib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (C) % of viability after 48 h of incubation with sunitinib. (D) hCLAT analysis 48 h of incubation with sunitinib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54 (E). DPRA analysis 24 h after incubation with regorafenib. Results are expressed as a percentage of cysteine depletion. (F) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with regorafenib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (G) % of viability after 48 h of incubation with regorafenib. (H) hCLAT analysis 48 h of incubation with regorafenib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. (I) DPRA analysis 24 h after incubation with sorafenib. Results are expressed as percentage of cysteine depletion. (J) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with sorafenib. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (K) % of viability after 48 h of incubation with sorafenib. (L) hCLAT analysis 48 h of incubation with sorafenib. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. Lactic acid (LA), 6-Methylcoumarin, and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCEB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean ± SEM (n = 3). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.



**Figure 5.** Analysis of delayed-type hypersensitivity of bevacizumab by KeratinoSens<sup>TM</sup> assay and human cell line activation test (hCLAT). (A) KeratinoSens<sup>TM</sup> analysis after 48 h of incubation with bevacizumab. Results are expressed as luciferase activity (Imax). (B) % of viability after 48 h of incubation with bevacizumab. (C) Human cell line activation test (hCLAT) analysis 48 h of incubation with bevacizumab. Results are expressed as relative fluorescence intensities of CD86 and CD54. Lactic acid (LA) and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCEB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean ± SEM (n = 3). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.



**Figure 6.** siRNA-VEGF1 mediates delayed-type hypersensitivity. (A) Representation of luciferase activity (Imax) after 48 h of incubation with siRNA-VEGF1, siRNA-VEGF2, and siRNA-VEGF3. (B) % of viability after 48 h of incubation with siRNA-VEGF1, siRNA-VEGF2, and siRNA-VEGF3. (C) Representation of relative fluorescence intensities of CD86 and CD54 after 48 h of incubation with siRNA-VEGF1, siRNA-VEGF2, and siRNA-VEGF3. Lactic acid (LA) and isopropanol were used as negative controls. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCEB), cinnamic aldehyde (CA), and nickel sulfate (NS) were used as positive controls. Shown are mean ± SEM (n = 3). The dashed line depicts the minimum positive stimulation index.

**3. Discussion**

Antineoplastic drugs cause delayed hypersensitivity leading to skin reactions ranging from a mild skin rash to life-threatening severe cutaneous adverse reactions, such as Stevens–Johnson Syndrome and toxic epidermal necrolysis [4,20,21]. Patients with Stevens–Johnson Syndrome and toxic epidermal necrolysis present with confluent, dusky erythematous to purpuric plaques, atypical target lesions, bullae, mucositis, and skin detachment. Mortality rates in the general population range from 1–5% for Stevens–Johnson Syndrome and 25–25%



for toxic epidermal necrolysis [22]. Despite the serious problem and the negative economic impact deriving from the market withdrawal of such drugs and high hospitalization costs, nowadays, there are no standard validated methods *in vitro* or *in vivo* to evaluate the sensitizing potential of drugs in the preclinical phase. For that, the aim of our work was to evaluate the sensitizing potential of different groups of antineoplastic agents grouped by mechanism of action although the results provided in this work cannot differentiate between the grade of severity of these skin hypersensitivity reactions.

In the last decade, incredible progress has been made in the development of a non-animal test to assess contact hypersensitivity. *In vitro* methods, such as the myeloid U937 skin sensitization test, hCLAT, and THP-1 activation assay, may be used in the preclinical phase of drug development for hazard identification of the potential to induce DTH. All three methods mentioned are based on the key mechanistic events underlying the awareness process described in the OECD report on AOP for skin sensitization [19]. For all the *in vitro* methods mentioned, the hypothesis is that traditional drugs or drug metabolites have low molecular weights (<1000 Da), and, as such, they are too small to be “detected” by T cells, and for these reasons, they are unable to spontaneously give an immune reaction. However, similar to chemical sensitizers, they can act as haptens by stably binding to carrier proteins and forming complete high molecular weight immunogenic compounds. Dendritic cells subsequently process this hapten and differentiate into a mature phenotype, characterized by the high expression of costimulatory molecules (CD86 and CD40), adhesion molecules (CD54, CD11a, CD2, and CD58), and release of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-18, and IL-8) [23]. After stimulation, a clone of T cells is produced capable of reacting to the antigen and therefore causing DTH [24].

Starting from the evidence that sensitizing drugs share the same mode of action with chemical sensitizers, we proposed to adapt DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and h-CLAT assays developed for skin sensitizers, also for the identification of the sensitizing potential of different antineoplastic drugs. Our results show that the *in vitro* assays described in this study could predict such reactions, which would be of potential interest for the preclinical development of numerous drugs.

The literature details that the taxanes, paclitaxel and docetaxel, generate delayed-type hypersensitivity causing severe cutaneous reactions [4,20]. In numerous patients, docetaxel and to lesser extent paclitaxel have been reported to cause chemotherapy-induced Stevens–Johnson Syndrome and toxic epidermal necrolysis [25–29]. In agreement with the literature, our results show that both taxanes are skin sensitizers since all three assays (DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and h-CLAT) are positive.

Another group of antineoplastics that also generates a lot of skin reactions are tyrosine kinase inhibitors that target the BCR-ABL, c-kit, and PDGF receptors [30–33]. Toxic epidermal necrolysis and Stevens–Johnson Syndrome have been described as skin effects related to the use of imatinib [31,33]. Fewer side effects have been reported for dasatinib and nilotinib, which can be due to the greater potency and specificity of the drugs. However, despite being more specific, significant skin effects are still being reported [33]. As in clinical practice, *in vitro*, all three drugs were positive following the prediction model described above.

In addition, we tested two antineoplastics, olaparib and palbociclib, which do not have many cutaneous effects in the clinic. Published clinical trials on palbociclib and olaparib show almost no skin toxicity (NCT01874353, NCT02000622, and NCT01942135). The “2 out of 3” prediction model suggests that both antineoplastics are not skin sensitizers. Therefore, the clinical data correlate with the results obtained in the *in vitro* techniques. This shows that the *in vitro* techniques are capable of detecting those compounds that are sensitizing versus those that are not.

Sunitinib, regorafenib, and sorafenib are small molecule inhibitors of the tyrosine kinase coupled to the VEGFR, as well as bevacizumab, which is a monoclonal antibody against VEGF and usually triggers dermatologic adverse events. There have been reports of typical delayed-type cutaneous hypersensitivity reactions, such as erythema multiforme,

Stevens–Johnson Syndrome, and skin rash due to treatment with these antineoplastics, especially with sorafenib [34–42]. Diagnoses of these delayed-type cutaneous hypersensitivities were biopsy-confirmed. The above clinical data correlate with the results obtained in the *in vitro* assays of this work. All three antineoplastics are considered positive since they are positive in at least two of the three assays. However, in KeratinoSens<sup>TM</sup> assay, sunitinib, regorafenib, and sorafenib, at the two highest plasma concentrations, are not able to activate the Nrf2 pathway because the drugs caused keratinocyte death (the viability was less than 50%). Supporting our results, a recent study identified that sorafenib inhibits mitogen-activated protein kinase MAP3K7 leading to cytotoxicity and keratinocyte injury [43,44]. Adverse skin effects related to DHT after bevacizumab administration are also described in the literature [45]. These findings demonstrate that DHT is independent of the molecule type and VEGF inhibitory pathway. Bevacizumab is considered positive since it is positive in the KeratinoSens<sup>TM</sup> and hCLAT assays. For DPRA, it was not possible to test it since the technique is designed to evaluate small molecules.

Finally, having confirmed the strong relationship between the patient’s clinical manifestations after antineoplastic administration and the results obtained with DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and h-CLAT, we wondered whether there was any mechanism of action that promoted the sensitization processes. We observed that VEGF inhibitors, with different structures, are sensitizing, so we silenced the different types of VEGF receptors to study whether sensitization is related to a specific signaling pathway. Our results show that the silencing of VEGFR1 results in the activation of the NRF2 pathway and increased expression of CD86; therefore, they are considered positive for KeratinoSens<sup>TM</sup> and h-CLAT, respectively, and therefore, the inhibition of VEGFR1 is thought to promote DTH. Previous reports have shown that the blockade of the VEGFR3 signaling pathway contributes to the delayed resolution of chronic skin inflammation [46,47]. However, to our knowledge, this is the first study that identifies the VEGFR1 pathway as a participant in delayed hypersensitivity processes.

Although these techniques were initially designed to determine the sensitizing potential of cosmetics [16,48], we have proven that they can be easily integrated into drug development for the preliminary identification of drug-induced DTH. Other studies have also used these *in vitro* techniques to assess the sensitizing potential of the systemic administration of nanomaterials and nanotechnology-formulated drug products [49] or to test another drugs, such as clonidine, ofloxacin, procainamide, abacavir, carbamazepine, among others [50–52]. However, none of the studies performs the sensitivity analysis by integrating the three *in vitro* techniques; instead, single tests are used, which may result in a less accurate prediction. Therefore, the use of the three techniques could be used for the rapid screening of multiple drugs that cause DTH. However, it is worth mentioning that the use of these techniques to determine the sensitization potential of a drug will only be possible when the mechanism of action of the drug does not interfere with the technique. If the mechanism of action interferes with the *in vitro* assays, *in vivo* models, such as the popliteal lymph node assay (PLNA) or its modifications, could be used in research studies for the identification of drugs that may cause DTH [53]. However, the non-animal test methods (DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and h-CLAT) exhibited good predictions when compared to PLNA data and even better predictions when compared to human data. The “2 out of 3” prediction model achieved accuracies of 90% or 79% when compared to human or PLNA data [18].

Rapid drug screening by these techniques would have several advantages. Among them, in many cases, the skin toxicities described are often related to the efficacy of the treatment; this prediction of the sensitizing potential *in vitro* could also give us a clue to the efficacy in clinical practice [54,55]. Moreover, due to the difficulties in the differentiation between delayed-type hypersensitivity reactions and type I hypersensitivity, misdiagnosis can occur and result in serious morbidity and mortality due to severe delayed-type hypersensitivity reactions that may occur upon readministration of the drug. Drug market withdrawal is also an important economic issue due to the extremely high costs associated

with the development of a drug [56]. Therefore, the use of alternative in vitro techniques described above to detect the sensitization potential during the development phase of a drug would increase safety and possibly reduce the risk of market withdrawal [51].

In conclusion, our results show that DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and h-CLAT are in vitro techniques capable of detecting the potential of antineoplastic to trigger DTH. Moreover, this is the first time that the inhibition of the VEGFR1 pathway has been identified as a potential trigger of DTH.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Chemicals and Reagents

Lactic acid (No. W261114-1KG-K), isopropanol (No. T9516-25ML), cinnamic aldehyde (No. W228613-100G-K), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) (No. 237329-10G), 6-methylcoumarin (No. W269905-100G-K), and nickel sulfate (No. N4882-1KG) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sunitinib (No. S7781), bevacizumab (No. A2006), palbociclib (No. S1116), imatinib (No. S2475), olaparib (No. S1060), dasatinib (No. S1021), nilotinib (No. S1033), bevacizumab (No. A2006), sorafenib (No. S7397), and regorafenib (No. S1178) were obtained from Selleckchem. Paclitaxel (No. HY-B0015) was purchased from MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA. Cysteine peptide (Ac-RFAAKAA-COOH) was purchased from Genosphere Biotechnologies, Paris, France. Peptide stock solutions were prepared to a final concentration of 0.667 mM in 100 mM phosphate buffer (pH of 7.5).

### 4.2. Antineoplastic

This study includes drugs that have clear in vivo DTH reported in the literature and other drugs with no reported in vivo DTH. Among them, drugs have different structures, mechanisms of action, and immune reactions. We selected taxanes as positive controls because of the well-known skin hypersensitivity reactions [4,20]. Different antineoplastic drugs that do not interact with the mechanism of action of DHT assays were also selected based on skin hypersensitivity clinical observations, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitors, BCR-ABL, c-KIT, and platelet-derived growth factor (PDGF) inhibitors or antineoplastics with no hypersensitivity clinical observations, such as olaparib and palbociclib. Selected drug concentrations used in in vitro DHT tests were based on human serum concentrations in steady-state after the common dosage described in the summary of product characteristics (European Medicines Agency).

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

When the antigen/allergen binds to the peptides of the skin (haptentization), these chemical-peptide adducts interact with keratinocytes and Langerhans cells. These events are evaluated by the DPRA assay [10]. Modified DPRA assay was proposed to address the molecular initiating event of the skin sensitization AOP, namely protein reactivity, by quantifying the reactivity of test chemicals toward model synthetic peptides containing either lysine or cysteine. In our case, we used the cysteine prediction method. Cysteine-peptide depletion values were then used to categorize a substance in one of four classes of reactivity for supporting the discrimination between skin sensitizers and nonsensitizers. The cysteine-peptide reactions were prepared in HPLC glass autosampler vials containing 0.5 mM of the peptide in combination with different concentrations of each test chemical. Calibration standards were prepared from the peptide stock solution at concentrations of 0.534, 0.267, 0.1335, 0.0667, 0.0334, and 0.0167 in 100 mM phosphate buffer (pH of 7.5) with 20% acetonitrile. Reaction controls were performed using DNCB and cinnamic aldehyde (positive controls) or lactic acid and 6-methyl coumarin (negative controls) at 5 mM. A reference control was also performed on the peptide solution at 0.5 mM with the solvent used (acetonitrile). The vials were capped, gently vortexed, and allowed to incubate in the dark at 25 °C for 24 h. Following incubation, the unreacted peptide was quantified by reverse-phase HPLC with UV detection. The chromatographic system comprised a Zorbax

SB-C18 column (2.1 mm × 100 mm × 3.5 micron (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). UV detection was performed by an SPD-10AV VP UV-vis (SHIMADZU) detector. Separation was achieved using a 0.35 mL/min flow rate with a gradient of mobile phase A (0.1% vol/vol TFA in water) and mobile phase B (0.085% vol/vol TFA in acetonitrile) over a 20 min period. The concentration of peptide was determined in each reaction from the absorbance at 220 nm. The appropriate peak was integrated yielding the peak area corresponding to the individual unreacted peptide in the test reactions, controls, and standards. A linear calibration curve was calculated based on the peptide concentration standards. The calibration curve was accepted as valid if the correlation coefficient (R<sup>2</sup>) was >0.990. The peptide reactivity was then reported as a percent of peptide depletion, which was determined as the reduction of the peptide concentration in the samples relative to the average concentration of the controls. The samples were analyzed and classified according to the cysteine 1:10 prediction model (threshold 13.89%) [10].

### 4.4. KeratinoSens<sup>TM</sup> Assay

Antigen/allergen keratinocyte activation generates oxidative stress via Keap1/Nrf2-ARE (antioxidant response element) and can be evaluated by KeratinoSens<sup>TM</sup> assay [11]. It uses an antioxidant response element (ARE)-coupled luciferase assay for the sensing of specific activation of Nrf2, which is a key regulator of the keratinocyte inflammatory response [57]. KeratinoSens<sup>TM</sup> assay addresses the second key event of the skin sensitization AOP, namely keratinocyte activation, by assessing, through luciferase induction, the Nrf2-mediated activation of the antioxidant response element (ARE)-dependent genes (OECD, 442D). Skin sensitizers have been reported to induce genes that are regulated by the ARE [58–60]. Small electrophilic substances, such as skin sensitizers, can act on the sensor protein Keap1 (Kelch-like 1/CH-associated protein 1), by, e.g., covalent modification of its cysteine residue, resulting in its dissociation from the transcription factor Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2). The dissociated Nrf2 can then activate ARE-dependent genes, such as those coding for phase II detoxifying enzymes [58,61].

The modified KeratinoSens<sup>TM</sup> assay was performed using KeratinoSens<sup>TM</sup> cell line, which was obtained from Givaudan (Vernier, Switzerland). The cells were cultured in DMEM supplemented with low glucose, Glutamax<sup>TM</sup>, Fetal Calf Serum (FCS) 9.1% (Armimed), and Geneticin<sup>TM</sup> (500 µg/mL) at 37 °C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. Upon reaching confluency of 80–90%, the cells were seeded in 96-well white plates (10,000 cells/well) for the luciferase assay. Cells were also seeded in clear 96-well plates for the MTT assay. After incubating for 24 h, the medium was replaced with an antibiotic-free medium containing 1% FCS. Before the assay, samples were dissolved in DMSO and diluted in a 1% FCS antibiotic-free medium before adding to the cells. Reaction controls were performed using DNCB (3.9 µM) and cinnamic aldehyde (32 µM) as positive controls and lactic acid (1000 µM) and isopropanol (1000 µM) as negative controls. A reference control was also with the solvent used (DMSO). Cells were treated with test samples or controls for 48 h. At the end of the incubation period, cells were washed with DPBS and incubated with lysis buffer for 20 min at room temperature. Promega firefly luciferase reagent was added, and the luminescence was immediately measured on a Lumistar plate reader (Lumistar Omega, BMG Labtech). An increase in luciferase activity in sample-treated cells was calculated in comparison to DMSO-treated cells (negative control). To determine the cell viability under similar experimental conditions, media were removed from the clear 96-well plate, and cells were incubated with a solution of MTT (0.6 mg/mL in serum-free media) for 4 h at 37 °C. The media were removed, and DMSO was added to each well to dissolve the blue formazan produced by the cells, the color of which was read at 600 nm on a plate reader (Infinite M200, Tecan). [11]. Fold luciferase activity induction was calculated by Equation (1), and the overall maximal fold induction (I<sub>max</sub>) was calculated as the average of the individual repetitions.

$$\text{Fold induction} = (L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}}) / (L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}}) \quad (1)$$

where  $L_{\text{sample}}$  is the luminescence reading in the test chemical well;  $L_{\text{blank}}$  is the luminescence reading in the blank well containing no cells and no treatment;  $L_{\text{solvent}}$  is the average luminescence reading in the wells containing cells and solvent (negative) control.

In order to be considered a positive prediction for KeratinoSens<sup>TM</sup>, the following conditions must be met in the 2 replicates of the experiment or in 2 of the 3 replicates, in case of discrepancy between the first and second replicate:

- The  $Im_{\text{max}}$  must be equal to or greater than 1.5 and statistically significant compared to the negative control.
- Cell viability must be greater than 70% for the lowest concentration of the compound with an  $Im_{\text{max}} \geq 1.5$
- There should be a dose–response increase in luminescence.

#### 4.5. Human Cell Line Activation Test (hCLAT)

Dendritic cells recognize the hapten–protein conjugate and migrate to regional lymph nodes through lymphatics. During migration, dendritic cells undergo differentiation and maturation processes, wherein various regulatory cytokines and cell surface maturation biomarkers, such as CD54 and CD86, are expressed [15]. The expression of CD54 and CD86 can be evaluated by hCLAT. Due to the complexity of isolation and high interdonor variability between primary human dendritic cell cultures, the researchers selected the monocyte–macrophage cell lines THP-1 and U-937. They found that these cells possess one of the properties of activated primary dendritic cells; i.e., they express CD86 and/or CD54 in response to allergens. The measured expression levels of CD86 and CD54 cell surface markers were then used for supporting the discrimination between skin sensitizers and nonsensitizers (OECD and 442E).

A modified hCLAT assay was performed in THP-1 cells (obtained from ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured in RPMI 1640 media supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Lonza, DE 17-602E, Basel, Switzerland). Test chemicals were dissolved in DMSO. The final DMSO concentration in the assay medium did not exceed 0.2%. For the cell activation assay, THP-1 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL per well in 24-well plates) were incubated for 24 h with various concentrations of test samples and controls. Isopropanol (1000 µM) and lactic acid (1000 µM) were employed as negative controls, and DNCB (10 µM) and nickel sulfate (900 µM) were employed as positive controls. Following exposure, the cells were first washed with FACS buffer (Invitrogen, Waltham, MA, USA, 00-4222-26) then resuspended and washed with a blocking buffer containing 0.01% globulins Cohn fraction II/III (G2388-10G, Sigma-Aldrich). Cells were then incubated for 30 min at 4 °C with the following monoclonal antibodies: APC mouse IgG1 (Dako, X0927), FITC mouse antihuman CD54 (Dako, F7143), and FITC mouse antihuman CD86 (Dako, F7205). The cells were washed and stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich, P4170-100MG), and the fluorescence intensity of the viable cells was analyzed using the BD LSR Fortessa X-20. The relative fluorescence intensities (RFIs) of CD86 and CD54 were calculated. If the RFI of CD86 or CD54 was greater than 150 or 200%, respectively, at any dose in at least two experiments, the test chemical was judged as a sensitizer [12]. To accept the hCLAT method, the cell viabilities of medium and solvent/vehicle controls should be higher than 90%, and for the test chemical, the cell viability should be more than 50%. Both acceptance criteria were met in our studies (data not shown).

#### 4.6. The “2 out of 3” Prediction Model

Based on the key event of AOP for skin sensitization (OECD, 2012c), we applied an approach that combined two or three test methods. The “2 out of 3” prediction model [18] uses any two congruent results of the three tests (DPRA, KeratinoSens<sup>TM</sup>, and hCLAT) to determine an overall assessment. If at least two of the three assays were positive, the chemical was classified as a skin sensitizer. If at least two of the three assays were negative, the chemical was classified as a nonsensitizer [62].

#### 4.7. Real-Time RT-PCR and siRNA Experiments in KeratinoSens<sup>TM</sup> and THP-1 Cells

Small interfering RNA (siRNA), including the scrambled siRNA control, was purchased from Ambion (Huntingdon, Cambridge, UK, catalog no. 4390843). FLT1 (*VEGFR1*) gene-targeted siRNA (identification no. ID192, catalog no. AM16708), KDR (*VEGFR2*) gene-targeted siRNA (identification no. ID145034, catalog no. AM16708), and FLT4 (*VEGFR3*) gene-targeted siRNA (identification no. ID145459, catalog no. AM16708) were designed by Ambion. Cells were transfected with siRNA (50 nM) in serum and antibiotic-free medium. The transfection reagent used was lipofectamine-2000 (Invitrogen, Paisley, UK; catalog no. 11668-027) at a final concentration of 2 µg/mL.

Total RNA was isolated using Trizol<sup>®</sup> Isolation Reagent (Roche, Indianapolis, IN, USA). The integrity of the extracted RNA was confirmed with Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Reverse transcription was performed in 300 ng of total RNA with a TaqMan reverse transcription reagents kit (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, USA). cDNA was amplified with specific primers and probes pre-designed by Applied Biosystems for FLT1 (ID 192), KDR (ID 145034), an FLT4 (ID 145459) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Universal Master Mix (Applied Biosystems). Expression of the target gene was expressed as the fold increase or decrease relative to the expression of  $\beta$ -actin as an endogenous control (Applied Biosystems; Hs01060665). The mean value of the replicates for each sample was calculated and expressed as the cycle threshold (Ct). The level of gene expression was then calculated as the difference ( $\Delta C_t$ ) between the  $C_t$  value of the target gene and the  $C_t$  value.

Silencing of the three genes (FLT1, KDR, and FLT4) was confirmed by PCR with the expression reduced by more than 90% (data not shown).

**Author Contributions:** Conceptualization, J.A.P.-F., J.M. and J.C.; formal analysis, I.R., P.M., A.G. and P.R.; funding acquisition, J.C.; investigation, P.M., J.M., A.G., P.R. and I.R.; methodology, I.R., P.M., J.M. and P.R.; project administration, J.C.; resources, J.C.; supervision, J.C., J.M. and J.A.P.-F.; validation, J.M., J.A.P.-F. and J.C.; writing—original draft, I.R.; writing—review and editing, P.M., J.M. and J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the grants PID2020-114871RB-I00 (JC) from Ministry of Science and Innovation, State Research Agency, by 2017/023/UV (JC) from Regional Government Prometeo “Generalitat Valenciana”, by P120/01363 (JM) from European Regional Development Fund (FEDER) and Instituto de Salud Carlos III and by CIBERES (CB06/06/0027) from the Spanish Government.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in the article.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Brandt, O.; Bircher, A.J. Delayed-type hypersensitivity to oral and parenteral drugs. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* **2017**, *15*, 1111–1132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Syrigou, E.; Makrilia, N.; Koti, I.; Saif, M.W.; Syrigos, K.N. Hypersensitivity reactions to antineoplastic agents: An overview. *Anticancer. Drugs* **2009**, *20*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Lenz, H.-J. Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist* **2007**, *12*, 601–609. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Haynes, D.; Ortega-Isoyza, A.G. Adverse cutaneous reactions to chemotherapeutic drugs. *Clin. Dermatol.* **2020**, *38*, 712–728. [[CrossRef](#)]
5. Brandi, G.; Pantaleo, M.A.; Galli, C.; Falcone, A.; Antonuzzo, A.; Mordenti, P.; Di Marco, M.C.; Biasco, G. Hypersensitivity reactions related to oxaliplatin (OHP). *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 477–481. [[CrossRef](#)]
6. Charles, A.J., Jr.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M.J. *Immunobiology*, 5th ed.; Garland Science: New York, NY, USA, 2001; ISBN 978-081-533-642-6.
7. Strickland, J.; Zang, Q.; Kleinstreuer, N.; Paris, M.; Lehmann, D.M.; Choksi, N.; Matheson, J.; Jacobs, A.; Lowit, A.; Allen, D.; et al. Integrated Decision Strategies for Skin Sensitization Hazard. *J. Appl. Toxicol. JAT* **2016**, *36*, 1150–1162. [[CrossRef](#)]



8. Weaver, J.L.; Chapdelaine, J.M.; Descotes, J.; Germolec, D.; Holsapple, M.; House, R.; Lebrec, H.; Meade, J.; Pieters, R.; Hastings, K.L.; et al. Evaluation of a lymph node proliferation assay for its ability to detect pharmaceuticals with potential to cause immune-mediated drug reactions. *J. Immunotoxicol.* **2005**, *2*, 11–20. [\[CrossRef\]](#)
9. Corsini, E.; Castla, M.; Tragni, E.; Galbiati, V.; Pallardy, M. Tools to investigate and avoid drug-hypersensitivity in drug development. *Expert Opin. Drug Discov.* **2018**, *13*, 425–433. [\[CrossRef\]](#)
10. Organisation for Economic Co-Operation and Development. In *Chemico Skin Sensitisation: Assays Addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins*; Test No. 442C; Organisation for Economic Co-Operation and Development: Paris, France, 2021. Available online: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation\\_9789264229709-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442c-in-chemico-skin-sensitisation_9789264229709-en) (accessed on 1 June 2022).
11. Organisation for Economic Co-Operation and Development. In *Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method*; Test No. 442D; Organisation for Economic Co-Operation and Development: Paris, France, 2018. Available online: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264229822-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en) (accessed on 1 June 2022).
12. Organisation for Economic Co-Operation and Development. In *Vitro Skin Sensitisation Assays Addressing the Key Event on Activation of Dendritic Cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation*; Test No. 442E; Organisation for Economic Co-Operation and Development: Paris, France, 2018. Available online: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation\\_9789264221444-en#page1](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264221444-en#page1) (accessed on 1 June 2022).
13. Organisation for Economic Co-Operation and Development. *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence*; Series on Testing and Assessment No. 168; Organisation for Economic Co-Operation and Development: Paris, France, 2012. Available online: [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/the-adverse-outcome-pathway-for-skin-sensitisation-initiated-by-covalent-binding-to-proteins\\_9789264221444-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/the-adverse-outcome-pathway-for-skin-sensitisation-initiated-by-covalent-binding-to-proteins_9789264221444-en#page1) (accessed on 1 June 2022).
14. United Nations. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*, 7th ed.; United Nations (UN), Ed.; United Nations: Geneva, NY, USA, 2017; ISBN 978-921-117-131-0.
15. Sakaguchi, H.; Ryan, C.; Oviagne, J.-M.; Schroeder, K.R.; Ashikaga, T. Predicting skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2010**, *24*, 1810–1820. [\[CrossRef\]](#)
16. Cho, S.-A.; Choi, M.; Park, S.-R.; An, S.; Park, J.-H. Application of Spectro-DPRA, KeratinoSens<sup>IM</sup> and h-CLAT to estimation of the skin sensitization potential of cosmetics ingredients. *J. Appl. Toxicol.* **2020**, *40*, 300–312. [\[CrossRef\]](#)
17. Bauch, C.; Kolle, S.N.; Fabian, E.; Pachel, C.; Ramirez, I.; Wiench, B.; Wruck, C.J.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. Intralaboratory validation of four in vitro assays for the prediction of the skin sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2011**, *25*, 1162–1168. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Urbisch, D.; Mehling, A.; Guth, K.; Ramirez, T.; Honarvar, N.; Kolle, S.; Landsiedel, R.; Jaworska, J.; Kern, P.S.; Gerberick, F.; et al. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol. KIP* **2015**, *71*, 337–351. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Galbiati, V.; Papale, A.; Kummer, E.; Corsini, E. In vitro Models to Evaluate Drug-Induced Hypersensitivity: Potential Test Based on Activation of Dendritic Cells. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 204. [\[CrossRef\]](#)
20. Ng, C.-Y.; Chen, C.-B.; Wu, M.-Y.; Wu, J.; Yang, C.-H.; Hui, R.C.-Y.; Chang, Y.-C.; Lu, C.-W. Anticancer Drugs Induced Severe Adverse Cutaneous Drug Reactions: An Updated Review on the Risks Associated with Anticancer Targeted Therapy or Immunotherapies. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 5376476. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Lin, C.-Y.; Wang, C.-W.; Hui, C.-Y.R.; Chang, Y.-C.; Yang, C.-H.; Cheng, C.-Y.; Chen, W.-W.; Ke, W.-M.; Chung, W.-H. Delayed-type hypersensitivity reactions induced by proton pump inhibitors: A clinical and in vitro T-cell reactivity study. *Allergy* **2018**, *73*, 221–229. [\[CrossRef\]](#)
22. Dodtük-Gad, R.P.; Chung, W.-H.; Valeyrie-Allanore, L.; Shear, N.H. Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: An Update. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2015**, *16*, 475–493. [\[CrossRef\]](#)
23. Quah, B.J.C.; O'Neill, H.C. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J. Cell. Mol. Med.* **2005**, *9*, 643–654. [\[CrossRef\]](#)
24. Martin, S.F. Allergic contact dermatitis: Xenoinflammation of the skin. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 720–729. [\[CrossRef\]](#)
25. Kattan, J.C.; Farhat, E.S.; Chahine, G.Y.; Nasr, F.L.; Moukadem, W.I.; Younes, H.C.; Yazbeck, N.J.; Ghosn, M.G.; Cancer Research Group. Weekly docetaxel, zoledronic acid and estramustine in hormone-refractory prostate cancer (HRPC). *Investig. New Drugs* **2008**, *26*, 75–79. [\[CrossRef\]](#)
26. Kilic, M.O.; Yalaza, M.; Bilgic, C.I.; Dener, C. Docetaxel-induced Scleroderma in A Breast Cancer Patient: A Case Report. *J. Breast Health* **2015**, *11*, 95–97. [\[CrossRef\]](#)
27. Sawada, Y.; Sugita, K.; Kabashima, R.; Nakamura, M.; Tokura, Y. Docetaxel-induced Stevens-Johnson syndrome with regenerating epidermis composed of atypical keratinocytes. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol. JFADV* **2009**, *23*, 1333–1335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Dourakis, S.P.; Sevastianos, V.A.; Alexopoulou, A.; Deutsch, M.; Stavriancas, N. Treatment side effects. Case 2. Toxic, epidermal, necrolysis-like reaction associated with docetaxel chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 3030–3032. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Hiraki, A.; Aoe, K.; Murakami, T.; Maeda, T.; Eda, R.; Takeyama, H. Stevens-Johnson syndrome induced by paclitaxel in a patient with squamous cell carcinoma of the lung: A case report. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 1135–1137. [\[PubMed\]](#)

30. Pretel-Irazabal, M.; Tüneu-Valls, A.; Ormaechea-Pérez, N. Adverse skin effects of imatinib, a tyrosine kinase inhibitor. *Actas Dermosifiliogr.* **2014**, *105*, 655–662. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Scheinfeld, N. Imatinib mesylate and dermatology part 2: A review of the cutaneous side effects of imatinib mesylate. *J. Drugs Dermatol. JDD* **2006**, *5*, 228–231.
32. Saglio, G.; Kim, D.-W.; Issaragrisil, S.; le Coutre, P.; Etienne, G.; Lobo, C.; Pasquini, R.; Clark, R.E.; Hochhaus, A.; Hughes, T.P.; et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 2251–2259. [\[CrossRef\]](#)
33. Armitay-Iaish, I.; Stemmer, S.M.; Iacouture, M.F. Adverse cutaneous reactions secondary to tyrosine kinase inhibitors including imatinib mesylate, nilotinib, and dasatinib. *Dermatol. Ther.* **2011**, *24*, 386–395. [\[CrossRef\]](#)
34. Namba, M.; Tsunemi, Y.; Kawashima, M. Sorafenib-induced erythema multiforme: Three cases. *Eur. J. Dermatol. EJD* **2011**, *21*, 1015–1016. [\[CrossRef\]](#)
35. Kodaira, M.; Takahashi, S.; Takeuchi, K.; Yuasa, I.; Saotome, T.; Yoneda, J.; Fukui, I.; Hatake, K. Sorafenib-induced erythema multiforme for metastatic renal cell carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2010**, *21*, 1563–1565. [\[CrossRef\]](#)
36. Bilac, C.; Mitezivoglu, T.; Ferretan, A.T.; Kayhan, T.C.; Temeltas, G.; Öztürkcan, S.; Temiz, P. Sorafenib-induced erythema multiforme in metastatic renal cell carcinoma. *Cutan. Ocul. Toxicol.* **2009**, *28*, 90–92. [\[CrossRef\]](#)
37. MacGregor, J.L.; Silvers, D.N.; Grossman, M.E.; Sherman, W.H. Sorafenib-induced erythema multiforme. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 527–528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Kollmannsberger, C.; Soulieres, D.; Wong, R.; Scalaria, A.; Gaspo, R.; Bjarnason, G. Sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma: Recommendations for management of side effects. *Can. Urol. Assoc. J.* **2007**, *1*, S41–S54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Rini, B.I.; Plimack, E.R.; Stus, V.; Gafanov, R.; Hawkins, R.; Nosov, D.; Pouliot, F.; Alekseev, B.; Soulieres, D.; Melichar, B.; et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 1116–1127. [\[CrossRef\]](#)
40. Mantovani, A.; Álvares-Da-Silva, M.R. Anaphylaxis preceded by erythema multiforme with sorafenib: First case report. *Ann. Hepatol.* **2019**, *18*, 777–779. [\[CrossRef\]](#)
41. Ikeda, M.; Fujita, I.; Mii, S.; Tanabe, K.; Tabata, K.; Matsumoto, K.; Satoh, T.; Iwamura, M. Erythema multiforme induced by sorafenib for metastatic renal cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2012**, *42*, 820–824. [\[CrossRef\]](#)
42. Akaza, H.; Isukamoto, T.; Murai, M.; Nakajima, K.; Naito, S. Phase II study to investigate the efficacy, safety, and pharmacokinetics of sorafenib in Japanese patients with advanced renal cell carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2007**, *37*, 755–762. [\[CrossRef\]](#)
43. Zimmerman, E.L.; Gibson, A.A.; Hui, S.; Vasilyeva, A.; Orwick, S.J.; Du, G.; Mascara, G.P.; Ong, S.S.; Chen, I.; Vogel, P.; et al. Multikinase Inhibitors Induce Cutaneous Toxicity through OAT6-Mediated Uptake and MAP3K7-Driven Cell Death. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 117–126. [\[CrossRef\]](#)
44. Yamamoto, K.; Mizumoto, A.; Nishimura, K.; Uda, A.; Mukai, A.; Yamashita, K.; Kume, M.; Makimoto, H.; Bito, T.; Nishigori, C.; et al. Association of Toxicity of Sorafenib and Sunitinib for Human Keratinocytes with Inhibition of Signal Transduction and Activator of Transcription 3 (STAT3). *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102110. [\[CrossRef\]](#)
45. Fam, A.; Finger, P.T. Cutaneous Cell-Mediated Delayed Hypersensitivity to Intravitreal Bevacizumab. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **2020**, *27*, 182–184. [\[CrossRef\]](#)
46. Hagura, A.; Asai, J.; Maruyama, K.; Takenaka, H.; Kinoshita, S.; Katoh, N. The VEGF-C/VEGFR3 signaling pathway contributes to resolving chronic skin inflammation by activating lymphatic vessel function. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *73*, 135–141. [\[CrossRef\]](#)
47. Huggenberger, R.; Siddiqui, S.S.; Brander, D.; Ullmann, S.; Zimmermann, K.; Antsiferova, M.; Werner, S.; Alitalo, K.; Detmar, M. An important role of lymphatic vessel activation in limiting acute inflammation. *Blood* **2011**, *117*, 4667–4678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Hoffmann, S.; Kleinstreuer, N.; Alépée, N.; Allen, D.; Api, A.M.; Ashika, T.; Clouet, E.; Cluzel, M.; Desprez, B.; Gellatly, N.; et al. Non-animal methods to predict skin sensitization (i): The Cosmetics Europe database. *Crit. Rev. Toxicol.* **2018**, *48*, 344–358. [\[CrossRef\]](#)
49. Potter, T.M.; Neun, B.W.; Dobrovolskaia, M.A. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2018; pp. 197–210.
50. Iulini, M.; Maddalon, A.; Galbiati, V.; Corsini, E. The Modified THP-1 Activation Assay for the In Vitro Identification of Drug-Inducing Systemic Hypersensitivity. *Front. Toxicol.* **2022**, *4*, 814050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Corti, D.; Galbiati, V.; Gatti, N.; Marinovich, M.; Galli, C.L.; Corsini, E. Optimization of the THP-1 activation assay to detect pharmaceuticals with potential to cause immune mediated drug reactions. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2015**, *29*, 1339–1349. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Iulini, M.; Maddalon, A.; Galbiati, V.; Marinovich, M.; Corsini, E. In vitro identification of drugs inducing systemic hypersensitivity reactions known in vivo to be associated with specific HLA genotypes. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2020**, *68*, 104953. [\[CrossRef\]](#)
53. Warbrick, E.V.; Deaman, R.J.; Kimber, I. Prediction of drug allergenicity: Possible use of the local lymph node assay. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2001**, *4*, 60–65.
54. Sohn, K.H.; Oh, S.Y.; Lim, K.W.; Kim, M.Y.; Lee, S.Y.; Kang, H.R. Sorafenib induces delayed-onset cutaneous hypersensitivity: A case series. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2015**, *7*, 304–307. [\[CrossRef\]](#)
55. Vincenzi, B.; Santini, D.; Russo, A.; Addeo, R.; Giuliani, F.; Montella, L.; Rizzo, S.; Venditti, O.; Frezza, A.M.; Caraglia, M.; et al. Early skin toxicity as a predictive factor for tumor control in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib. *Oncologist* **2010**, *15*, 85–92. [\[CrossRef\]](#)



56. Pieters, R. Detection of autoimmunity by pharmaceuticals. *Methods San Diego Calif.* **2007**, *41*, 112–117. [[CrossRef](#)]
57. Höper, T.; Mussotter, F.; Haase, A.; Luch, A.; Tralau, T. Application of proteomics in the elucidation of chemical-mediated allergic contact dermatitis. *Toxicol. Res.* **2017**, *6*, 595–610. [[CrossRef](#)]
58. Natsch, A. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers—functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2010**, *113*, 284–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Natsch, A.; Emter, R. Skin Sensitizers Induce Antioxidant Response Element Dependent Genes: Application to the In Vitro Testing of the Sensitization Potential of Chemicals. *Toxicol. Sci.* **2008**, *102*, 110–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Emter, R.; Ellis, G.; Natsch, A. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *245*, 281–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Kansanen, E.; Kuosmanen, S.M.; Leinonen, H.; Levonen, A.-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 45–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Natsch, A.; Gerberick, G.F. Integrated skin sensitization assessment based on OECD methods (II): Hazard and potency by combining kinetic peptide reactivity and the “2 out of 3” Defined Approach. *ALTEX* **2022**. [[CrossRef](#)]