



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA
FOTO(GENO)TOXICIDAD INDUCIDA POR
FÁRMACOS FOTOACTIVOS Y SUS METABOLITOS**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Guillermo García Lainez

Dirigida por:

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Dr. Ignacio Vayá Pérez

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Julio, 2024



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA



Programa de Doctorado:

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Título:

Evaluación *in vitro* de la foto(geno)toxicidad inducida por fármacos fotoactivos y sus metabolitos

Tesis doctoral presentada por:

Guillermo García Lainez

Directores de Tesis:

Dra. Inmaculada Andreu Ros

Dr. Ignacio Vayá Pérez

Tutor Académico UV:

Dr. Roque Bort Martí

Valencia, Julio 2024

Fdo: Dr. Roque Bort Martí

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los proyectos:

Nombre del proyecto: PI16/01877 Estrategia integrada de fotodiagnóstico combinando evaluación clínica, ensayos biológicos y estudios mecanísticos.

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III

Investigador Principal: Inmaculada Andreu Ros.

Nombre del proyecto: PID2020-115010RB-I00 Fotocomportamiento de los Inhibidores de la Tirosina Quinasa: de Disolución a Células.

Entidad financiadora: Agencia Estatal de Investigación

Investigadores Principales: Inmaculada Andreu Ros e Ignacio Vayá Pérez

Índice

Capítulo 1. Introducción general	1
1.1. La radiación solar	3
1.2. Procesos fotofísicos y fotoquímicos de moléculas	6
1.3. Procesos de fotosensibilización a biomoléculas	9
1.4. Manifestaciones clínicas de la fotosensibilidad inducida por fármacos y su fotodiagnóstico.....	15
1.5. Familias de fármacos con capacidad fotosensibilizante.....	20
1.6. Implicación del metabolismo de fármacos en las reacciones de fotosensibilidad.	26
Capítulo 2. Objetivos	31
Capítulo 3. Materiales y Métodos	35
3.1. Selección de los fármacos a estudio	37
3.2. Instrumentación general.	39
3.3. Técnicas de cultivos celulares	40
3.4. Ensayo de fototoxicidad <i>in vitro</i> 3T3 de captación de rojo neutro (NRU)	43
3.5. Ensayo de fotooxidación de proteínas.....	45
3.6. Ensayo de fotosensibilización al ADN plasmídico.....	46
3.7 Ensayo de electroforesis en gel de célula individual en condiciones alcalinas (ensayo <i>comet</i>).....	49

3.8. Ensayo de reparación del daño al ADN cromosómico.....	53
3.9. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Elisa) para la cuantificación del marcador 8-oxo-dG.....	54
3.10. Análisis y tratamiento estadístico de los resultados.	56
Capítulo 4. Alteraciones en la foto(geno)toxicidad del fármaco diclofenaco asociadas a la hidroxilación del grupo cromóforo durante su biotransformación	59
4.1. Introducción	61
4.2. Resultados y discusión	63
4.2.1. Estudio de la fototoxicidad.....	64
4.2.2. Estudio del mecanismo de fototoxicidad	67
4.2.4. Estudio de la fotogenotoxicidad.....	69
4.3. Conclusiones.....	78
4.4. Procedimiento experimental	78
4.4.1. Reactivos	78
4.4.2. Medidas de fluorescencia	78
Capítulo 5. Estudio <i>in vitro</i> de la foto(geno)toxicidad asociada al fármaco antitumoral lapatinib	81
5.1. Introducción	83
5.2. Resultados y discusión	86
5.2.1. Internalización celular	86
5.2.2. Estudio de la fototoxicidad.....	89

5.2.3. Estudio de la fotogenotoxicidad.....	93
5.3. Conclusiones.....	100
5.4. Procedimiento experimental	101
5.4.1. Reactivos.....	101
5.4.2. Medidas de fluorescencia	101
5.4.3. Localización celular por microscopía confocal.....	102
Capítulo 6. Daño celular oxidativo fotosensibilizado por el fármaco inhibidor de proteasas simeprevir.	103
6.1. Introducción	105
6.2. Resultados y discusión	108
6.2.1. Estudio de la fototoxicidad.....	108
6.2.2. Estudio de la fotooxidación de proteínas y lípidos	110
6.2.3. Estudio de la fotogenotoxicidad.....	115
6.2.4. Estudio fotofísico e interacción con biomoléculas. ..	120
6.3. Conclusiones.....	121
6.4. Procedimiento experimental	122
6.4.1. Reactivos.....	122
6.4.2. Ensayo de peroxidación lipídica fotoinducida.....	122

Capítulo 7. Estudio de la fotomutagenicidad inducida por el ansiolítico clorpromazina y sus metabolitos <i>N</i>-demetilados .	123
7.1. Introducción	125
7.2. Resultados y Discusión	128
7.2.1. Estudio de la reparación del daño al ADN.	128
7.2.2. Estudio de la fotomutagenicidad mediante secuenciación de nueva generación (NGS).....	130
7.3. Conclusiones.....	134
7.4. Procedimiento experimental	135
7.4.1. Reactivos	135
7.4.2. Secuenciación masiva de nueva generación (NGS) ..	135
Capítulo 8. Conclusiones.....	137
Bibliografía	145
Anexos: Contribuciones científicas.....	173

Abreviaturas y Acrónimos

λ	Longitud de onda
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
4'OH-DCF	4'-hidroxidiclofenaco
5OH-DCF	5-hidroxidiclofenaco
8-oxo-dG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
A	Absorción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (del inglés “American type culture collection”)
BER	Reparación por escisión de bases (del inglés “Base excision repair”)
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPZ	Clorpromazina
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DCF	Diclofenaco
DE	Desviación estándar
DDMCPZ	Didemetilclorpromazina
DMCPZ	Demetilclorpromazina
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (del inglés “Dulbecco’s modified Eagle’s medium”)

DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DSB	Corte de doble cadena (del inglés “Double strand break”)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGFR	Receptores del factor de crecimiento epidérmico (del inglés “Epidermal growth factor receptor”)
Elisa	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMA	Agencia Europea del Medicamento (del inglés “European Medicines Agency”)
Endo III	Endonucleasa III
Endo V	Endonucleasa V
F	Fluorescencia
FBS	Suero fetal bovino (del inglés “Fetal bovine serum”)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos (del inglés “Food and Drug Administration”)
FFB	Fenofibrato
FPG	ADN formamidopirimidin glicosilasa
FS	Fotosensibilizador
FSK	Fibroblastos dérmicos humanos
FSM	Furosemda
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés “Human epidermic receptor”)
HR	Recombinación homóloga (del inglés “Homologous recombination”)
HRP	Peroxidasa de rábano (del inglés “Horseradish peroxidase”)

HSA	Albúmina sérica humana (del inglés “Human Serum Albumin”)
HTC	Hidroclorotiazida
IC50	Concentración inhibitoria del 50 %
IR	Radiación Infrarroja
KP	Ketoprofeno
LAP	Lapatinib
LMX	Lomefloxacina
MTX	Metotrexato
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (del inglés “Nucleotide excision repair”)
NGS	Secuenciación de nueva generación (del inglés “Next generation sequencing”)
<i>N</i>-LAP	<i>N</i> -lapatinib
NRU	Captación de rojo neutro (del inglés “Neutral red uptake”)
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
<i>O</i>-LAP	<i>O</i> -lapatinib
P	Fosforescencia
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés “Phosphate buffered saline”)
PIF	Factor fotoirritante (del inglés “Photoirritation factor”)
PMT	Prometazina

ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés “Reactive oxygen species”)
RS	Radiación solar
RV	Relajación vibracional
S₀	Estado fundamental
S_N	Estado excitado singlete
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIM	Simeprevir
SMV	Simvastatina
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (del inglés “Single nucleotide polymorphism”)
SSB	Corte de cadena simple (del inglés “Single strand break”)
T_N	Estado excitado triplete
TKI	Inhibidor de la actividad tirosina quinasa (del inglés “Tyrosin kinase inhibitor”)
UV	Ultravioleta
VAN	Vandetanib
VEM	Vemurafenib
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIS	Visible
VOR	Voriconazol

Figuras y Tablas

Índice de Figuras

Figura 1.1. Beneficios y efectos perjudiciales de la radiación solar en la salud.....	4
Figura 1.2. Composición de la radiación solar que llega a la superficie terrestre y su penetración en las diferentes capas de la piel humana.....	5
Figura 1.3. Diagrama de Jablonsky modificado de los niveles energéticos de una molécula tras la absorción (A) de radiación: Singlete (S) y triplete (T) y las rutas de desactivación.....	8
Figura 1.4. Procesos de fotosensibilización a biomoléculas a nivel celular.....	10
Figura 1.5. Principales mecanismos celulares de reparación del ADN dañado.....	14
Figura 1.6. Fototest para determinar la existencia de fotosensibilidad en la piel. Fotoparche para el diagnóstico de la fotoalergia.....	19
Figura 1.7. Estructura química de los fármacos con capacidad fotosensibilizante agrupados por su funcionalidad.....	22
Figura 1.8. Esquema general del metabolismo de fármacos.....	27
Figura 3.1. Estructuras químicas de los fármacos objeto de estudio.....	38
Figura 3.2. Fotorreactor modelo LZC-4 (Luzchem).....	39
Figura 3.3. Morfología de los cultivos celulares en confluencia.....	41
Figura 3.4. Procedimiento del ensayo <i>in vitro</i> de fototoxicidad 3T3 NRU.....	43
Figura 3.5. Ensayo de fotooxidación de proteínas por el método DNPH.....	45
Figura 3.6. Conformaciones de un plásmido y su movilidad electroforética.....	47

Figura 3.7. Fundamento del ensayo <i>comet</i> en condiciones alcalinas para la detección de daño al ADN.....	49
Figura 3.8. Procedimiento del ensayo <i>comet</i> en condiciones alcalinas.....	50
Figura 3.9. Escala visual para la clasificación de los <i>comets</i> según la cantidad de lesiones en el ADN.....	53
Figura 3.10. Procedimiento del ensayo Elisa de tipo competitivo.....	54
Figura 4.1. Mecanismo de acción del fármaco diclofenaco.....	61
Figura 4.2. Estructuras químicas y espectros de absorción del diclofenaco (DCF) y sus metabolitos 4'OH-DCF y 5OH-DCF.....	63
Figura 4.3. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular de las células 3T3 tratadas con DCF y sus metabolitos 4'OH-DCF y 5OH-DCF.....	66
Figura 4.4. Formación del fotoproducto clorocarbazol del DCF.....	67
Figura 4.5. Emisión de fluorescencia de los fotoproductos formados después de irradiar el DCF y sus metabolitos (4'OH-DCF y 5OH-DCF) con UVA (5 J/cm ²).....	68
Figura 4.6. Gel de agarosa (1 %) del plásmido pBR322 (250 ng) en presencia de DCF y sus metabolitos (100 µM), en oscuridad (-) o irradiado con luz UVA (+).....	70
Figura 4.7. Porcentaje de formación de la Forma II del plásmido pBR322 tratado con DCF y sus metabolitos (100 µM) irradiados con luz UVA (+, 15 J/cm ²) o mantenidos en oscuridad (-) y posterior digestión con las enzimas de reparación Endo V, Endo III y FPG.....	72
Figura 4.8. Imágenes representativas del ensayo <i>comet</i> en condiciones alcalinas del DCF y sus metabolitos (100 µM).....	74
Figura 4.9. Capacidad de reparación del ADN dañado a diferentes tiempos (3 h, 6 h y 18 h) de las células FSK tratadas con DCF y sus metabolitos (100 µM) en combinación con luz UVA.....	77

Figura 5.1. Estructura, activación y función de los receptores de la familia EGFR y su modulación por los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs).....	84
Figura 5.2. Estructuras químicas del lapatinib (LAP) y sus metabolitos <i>N</i> -lapatinib (<i>N</i> -LAP) y <i>O</i> -lapatinib (<i>O</i> -LAP)	85
Figura 5.3. Espectros de absorción del LAP (negro) y sus metabolitos <i>N</i> -LAP (rojo) y <i>O</i> -LAP (azul) en micelas de CTAB (5 μ M). Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 320$ nm) del LAP, <i>N</i> -LAP y <i>O</i> -LAP.....	87
Figura 5.4. Localización intracelular del LAP (izquierda), <i>O</i> -LAP (centro) y <i>N</i> -LAP (derecha) por microscopía confocal (fluorescencia verde)	88
Figura 5.5. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular de células 3T3 tratadas con LAP (A), y sus metabolitos <i>O</i> -LAP (B) y <i>N</i> -LAP (C) en condiciones de oscuridad (negro) o irradiadas con luz UVA (5 J/cm ² , violeta).....	90
Figura 5.6. Fotooxidación de la proteína HSA por el LAP y sus metabolitos.....	92
Figura 5.7. (A) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pBR322 (250 ng) sólo (CN) o en presencia de LAP y sus metabolitos <i>O</i> -LAP y <i>N</i> -LAP (30 μ M), en oscuridad (-) o irradiados con luz UVA (+, 15 J/cm ²)	94
Figura 5.8. Porcentaje de formación de la Forma II del plásmido pBR322 (250 ng) tratado con LAP y sus metabolitos <i>O</i> -LAP y <i>N</i> -LAP (30 μ M) en presencia (+) o ausencia (-) de irradiación UVA (15 J/cm ²) mediante digestión con las enzimas Endo V, Endo III y FPG.....	96
Figura 5.9. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo <i>comet</i> para el LAP, <i>N</i> -LAP y <i>O</i> -LAP (30 μ M).....	97
Figura 5.10. Porcentaje de daño en el ADN cromosómico inducido por LAP, <i>N</i> -LAP y <i>O</i> -LAP (30 μ M) mediante escala visual en oscuridad (-) o irradiadas con luz UVA (+, 2.5 J/cm ²).....	98

Figura 5.11. Formación de 8-oxo-dG en el ADN genómico de las células FSK no tratadas (CN) o tratadas con LAP o sus metabolitos O-LAP y N-LAP (30 μ M) en oscuridad (-) o irradiadas con luz UVA (+, 2.5 J/cm ²).	100
Figura 6.1. Mecanismo de acción del simeprevir (SIM) como antiviral del virus de la hepatitis C (VHC) en hepatocitos humanos.	105
Figura 6.2. Estructura química del antiviral SIM y espectro de absorción realizado en PBS (30 μ M).....	108
Figura 6.3. Curva dosis-respuesta de viabilidad celular del SIM mediante el ensayo 3T3 NRU en presencia de luz UVA (azul) o condiciones de oscuridad (rojo).....	109
Figura 6.4. Detección de la peroxidación lipídica por el Bodipy C11 581/591.....	110
Figura 6.5. Peroxidación lipídica fotosensibilizada por SIM en células FSK.....	112
Figura 6.6. Ratio de intensidad de fluorescencia (RIF) entre la forma no oxidada del Bodipy C11 y su forma oxidada en las células.....	113
Figura 6.7. Fotooxidación de HSA inducida por SIM.....	114
Figura 6.8. Electroforesis en gel de agarosa (1 %) del plásmido pBR322 (250 ng) irradiado en presencia (+) o ausencia (-) de SIM. Adicionalmente, las muestras fueron digeridas con las enzimas de restricción (Endo V, Endo III y FPG)	116
Figura 6.9. Formación de 8-oxo-dG en el ADN genómico de las células FSK tratadas con SIM (2.5 J/cm ²) en oscuridad (■) o irradiadas con luz UVA (□, 2.5 J/cm ²).....	117
Figura 6.10. Daño fotoinducido al ADN genómico mediante ensayo <i>comet</i> en condiciones alcalinas.....	119

Figura 7.1. Estructura química de la clorpromazina (CPZ) y sus metabolitos DMCPZ y DDMCPZ. Espectros de absorción de CPZ (negro), DMCPZ (rojo) y DDMCPZ (azul) en PBS (10 μ M).....126

Figura 7.2. Ensayo *comet* en condiciones alcalinas de células FSK solas o tratadas con CPZ, DMCPZ y DDMCPZ (10 μ M) e irradiadas con luz UVA (2.5 J/cm²).....129

Figura 7.3. Fotomutagenicidad inducida por la CPZ y sus metabolitos DMCPZ y DDMCPZ en las células FSK analizada mediante NGS.....133

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Características diferenciales de las reacciones de fotosensibilidad inducidas por fármacos: fototoxicidad y fotoalergia.....16

Tabla 1.2. Revisión bibliográfica de los mecanismos celulares y moleculares de fotosensibilidad asociados a fármacos.....23

Tabla 3.1. Información sobre los fármacos objeto de estudio.....38

Tabla 4.1. Fototoxicidad del DCF y sus metabolitos en el ensayo 3T3 NRU.....65

Tabla 5.1. Fototoxicidad del LAP y sus metabolitos en el ensayo 3T3 NRU.....89

Tabla 7.1. Control de calidad de la secuenciación NGS de las muestras. 131

Tabla 7.2. Características de las regiones polimórficas analizadas mediante NGS. Las localizaciones cromosómicas se corresponden al ensamblaje GRCh37.....132

Resumen

Las reacciones adversas de fotosensibilización por fármacos constituyen un problema de salud pública en la actualidad que en ocasiones no llega a diagnosticarse adecuadamente. Su incidencia ha aumentado de forma progresiva en los últimos años como consecuencia de los cambios en el estilo de vida de la población con un mayor desarrollo de actividades al aire libre, y una creciente exposición a la acción combinada de fármacos y luz solar.

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado una metodología basada en técnicas con cultivos celulares (ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 NRU y ensayo *comet*) y bioquímicas con biomoléculas modelo para identificar aquellos fármacos con propiedades fotosensibilizantes. Esta metodología tiene en consideración los metabolitos que se forman durante el proceso de biotransformación de un fármaco, principalmente, por acción de la familia de citocromos P450. Aunque por regla general los metabolitos generados disminuyen el potencial tóxico de un fármaco, en ocasiones, éstos pueden actuar como fotosensibilizadores *in situ*, y resultar ser más reactivos y tóxicos que el fármaco original.

Esta estrategia se ha aplicado con éxito en una lista de fármacos realizada tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica en bases de datos biomédicas y ha permitido identificar a los siguientes fármacos como agentes fotosensibilizantes: diclofenaco, perteneciente a la familia de los anti-inflamatorios no esteroideos; lapatinib, inhibidor de la tirosina quinasa con propiedades antitumorales, y el simeprevir, antiviral inhibidor de la serina-proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C. Para cada uno de estos

fármacos y sus principales metabolitos, a lo largo de esta tesis doctoral, se profundiza en investigar los mecanismos de foto(geno)toxicidad desde el punto de vista molecular y celular. Por último, en esta tesis se presenta la técnica de secuenciación masiva de nueva generación NGS como alternativa al ensayo *comet* para el estudio de la fotomutagenicidad de un fármaco. El estudio piloto comparativo entre ambas técnicas se llevó a cabo con el fármaco clorpromazina, ansiolítico que posee propiedades foto(geno)tóxicas, junto con sus principales metabolitos fotorreactivos.

Con esta tesis doctoral, se han generado nuevos conocimientos sobre los mecanismos a nivel molecular y celular que intervienen en los trastornos de fotosensibilidad mediada por fármacos. Así, se ha conseguido desarrollar una herramienta que permite una evaluación temprana del riesgo fotobiológico de nuevos compuestos bioactivos obtenidos de los procesos de cribado farmacológico, contribuyendo a una racionalización en el diseño químico y a una disminución de la fototoxicidad asociada.

Abstract

Adverse drug photosensitization reactions constitute nowadays a public health problem which is sometimes not properly diagnosed. Its prevalence on population has progressively increased in recent years as a consequence of changes in the lifestyle with greater development of outdoor activities and increasing exposure to the combined action of drugs and sunlight.

In this doctoral thesis, a methodology based on techniques with cell cultures (*in vitro* 3T3 NRU phototoxicity assay and *comet* assay) and model biomolecules has been developed to identify those drugs with photosensitizing properties. This methodology takes into account those metabolites that are formed during the biotransformation process of a drug, mainly by the action of the cytochrome P450 family. Although as a general rule the metabolites generated reduce the toxic potential of a drug, sometimes they can act as photosensitizers *in situ*, and even turn out to be more reactive and toxic than the parent drug.

This strategy has been successfully applied to a list of drugs selected after an exhaustive bibliographic research in biomedical databases and has allowed the identification as photosensitizing agents of the drug diclofenac, belonging to the family of non-steroidal anti-inflammatory drugs, lapatinib, a tyrosine-kinase inhibitor with antitumor properties, and simeprevir, an antiviral inhibitor of the serine protease NS3/4A of the hepatitis-C virus. For each of these drugs and their main metabolites, throughout this doctoral thesis, the mechanisms of photo(geno)toxicity are explored from a molecular and cellular point of view. Finally, in this thesis, the next generation sequencing technique (NGS) is presented as an alternative to the

comet assay for the study of the photomutagenicity. The comparative pilot study between both techniques has been carried out with the drug chlorpromazine, an anxiolytic that has photo(geno)toxic properties, along with its main photoreactive metabolites.

With this doctoral thesis, new knowledge has been generated about the molecular mechanisms at the molecular and cellular level that take place in drug-mediated photosensitivity disorders. This will allow the development of a tool to early evaluate the photobiological risk of new bioactive compounds obtained from pharmacological screening contributing to a rationalization in the chemical design with reduced phototoxicity.

Resum

Les reaccions adverses de fotosensibilització per fàrmacs constitueixen un problema de salut pública en l'actualitat que a vegades no arriba a diagnosticar-se adequadament. La seua incidència ha augmentat de manera progressiva en els últims anys a conseqüència dels canvis en l'estil de vida de la població amb un major desenvolupament d'activitats a l'aire lliure, i una creixent exposició a l'acció combinada de fàrmacs i llum solar.

En la present tesi doctoral s'ha desenvolupat una metodologia basada en tècniques amb cultius cel·lulars (assaig *in vitro* de fototoxicitat 3T3 NRU i assaig *comet*) i bioquímiques amb biomolècules model per a identificar aquells fàrmacs amb propietats fotosensibilitzants. Esta metodologia té en consideració els metabòlits que es formen durant el procés de biotransformació d'un fàrmac, principalment, per acció de la família de citocroms P450. Encara que per regla general els metabòlits generats disminueixen el potencial tòxic d'un fàrmac, a vegades, estos poden actuar com fotosensibilitzadors *in situ*, i resultar ser més reactius i tòxics que el fàrmac original.

Esta estratègia s'ha aplicat amb èxit en una llista de fàrmacs realitzada després d'una exhaustiva cerca bibliogràfica en bases de dades biomèdiques i ha permés identificar als següents fàrmacs com a agents fotosensibilitzants: diclofenac, pertanyent a la família dels anti-inflamatoris no esteroïdals; lapatinib, inhibidor de la tirosina cinasa amb propietats antitumorals, i el simeprevir, antiviral inhibidor de la serina-proteasa NS3/4A del virus de l'hepatitis C. Per a cadascun d'estos fàrmacs i els seus principals metabòlits, al llarg d'esta tesi doctoral, s'aprofundix a investigar els mecanismes de

foto(geno)toxicitat des del punt de vista molecular i cel·lular. Finalment, en esta tesi es presenta la tècnica de seqüenciació massiva de nova generació NGS com a alternativa a l'assaig *comet* per a l'estudi de la fotomutagenicitat d'un fàrmac. L'estudi pilot comparatiu entre totes dues tècniques es va dur a terme amb el fàrmac clorpromazina, ansiolític que posseïx propietats foto(geno)tòxiques, juntament amb els seus principals metabòlits fotoreactius.

Amb esta tesi doctoral, s'han generat nous coneixements sobre els mecanismes a nivell molecular i cel·lular que intervenen en els trastorns de fotosensibilitat mediata per fàrmacs. Així, s'ha aconseguit desenvolupar una ferramenta que permet una avaluació primerenca del risc fotobiològic de nous compostos bioactius obtinguts dels processos de cribratge farmacològic, contribuint a una racionalització en el disseny químic i a una disminució de la fototoxicitat associada.

Capítulo 1. Introducción general

1.1. La radiación solar.

La radiación solar (RS) es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la vida en nuestro planeta. Los humanos nos exponemos a diario a dosis de RS que tienen un impacto directo en la salud (Figura 1.1). Entender cómo ésta afecta a nuestra salud es un reto importante en la actualidad porque todavía no hay definida una dosis de exposición óptima, la cual será muy variable entre las personas, teniendo en cuenta factores como la edad, el grupo étnico de las personas, el tipo de piel según la escala de Fitzpatrick, así como del nivel de adaptación previo (1).

En este contexto, pequeñas dosis de RS aportan al ser humano numerosos beneficios: ayuda a la regulación de los ritmos circadianos (2), contribuye a una mejora en el estado de ánimo a través de la síntesis de las hormonas melatonina y serotonina (3), participa en la síntesis cutánea de vitamina D esencial para el sistema esquelético porque regula la homeostasis tanto del calcio como del fósforo (4) y modula la presión arterial estimulando la liberación de los reservorios de óxido nítrico en la piel (5). Por el contrario, una exposición prolongada y sin protección adecuada es responsable de la denominada “cara oculta del sol” con efectos nocivos tanto a corto como a largo plazo. Entre ellos destacan la producción de eritemas y quemaduras cutáneas (6), debilitamiento del sistema inmunitario (7), envejecimiento prematuro de la piel (8), desarrollo de cataratas oculares (9), aparición de fotodermatosis (10) y cánceres de piel (11). En concreto, los cánceres más frecuentes en la población española son los de células basales y escamosas, seguidos de los melanomas con una incidencia anual acumulada de 253, 28 y 9, respectivamente, por cada 100000 habitantes (12).

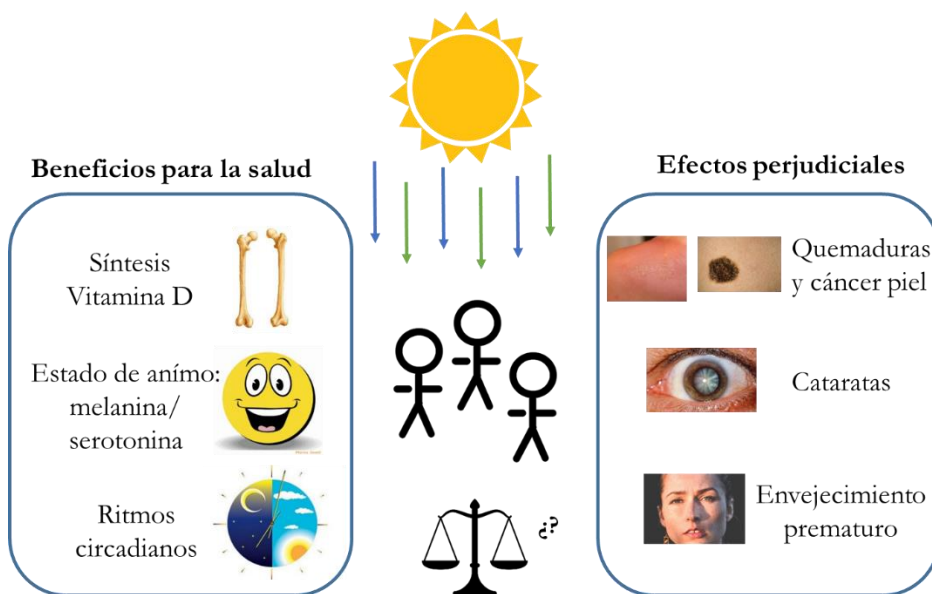


Figura 1.1. Beneficios y efectos perjudiciales de la radiación solar en la salud.

La RS que llega a la superficie terrestre comprende un rango amplio del espectro electromagnético e incluye radiación ultravioleta (UV) con una longitud de onda (λ) en el rango 200 - 400 nm; radiación visible (VIS) que abarca el rango 400 - 800 nm y la radiación infrarroja (> 1000 nm) (13), según se observa en la Figura 1.2. De todas ellas, la radiación UV es la más energética y potencialmente dañina, a pesar de que únicamente representa entre un 5-10 % del conjunto de RS (13). La composición espectral de la RS y su intensidad no son uniformes en el planeta, sino que oscilan y dependen del periodo del día, de la estación climática, del tiempo meteorológico en la región y también de otros aspectos geográficos como la latitud y la altitud (14). Para un estudio más detallado y debido a una gran oscilación de los efectos biológicos mostrados con las diferentes λ , la radiación UV se

subdivide a su vez en tres regiones: radiación UVC (200 - 290 nm), radiación UVB (290 -320 nm) y la radiación UVA (320 - 400 nm).

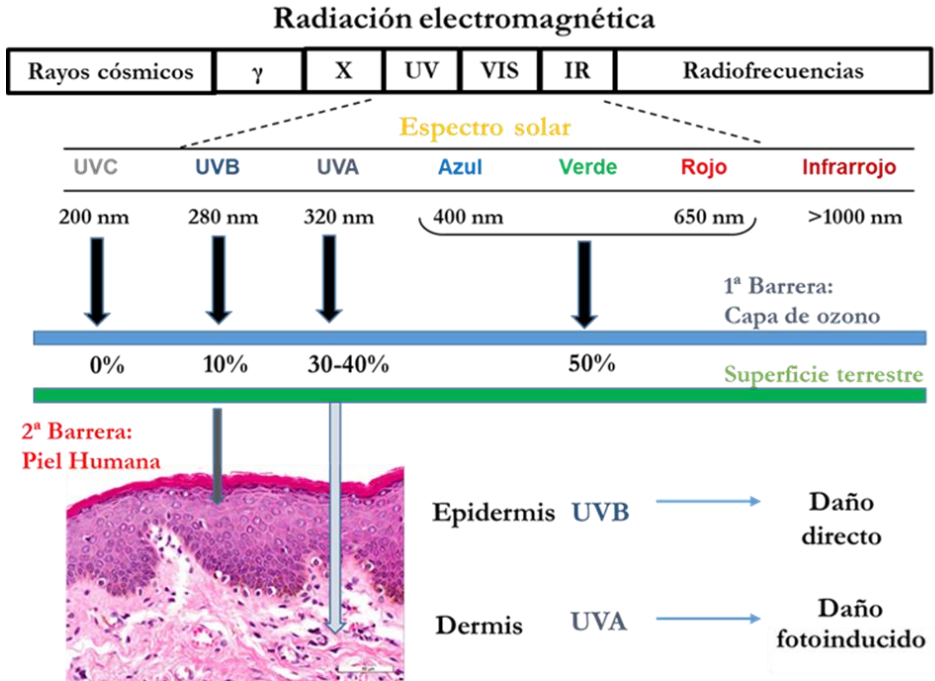


Figura 1.2. Composición de la radiación solar que llega a la superficie terrestre y su penetración en las diferentes capas de la piel humana.

Afortunadamente, sólo una pequeña proporción de la radiación UV que llega a nuestro planeta es capaz de alcanzar con éxito el interior del cuerpo humano por la presencia de diversas barreras que desempeñan una función protectora (Figura 1.2). La primera barrera física es la capa de ozono, que se localiza en la estratosfera y es capaz de absorber con total eficacia toda la radiación UVC y un 95 % la radiación UVB, evitando así que alcancen la superficie terrestre (15). La piel constituye la segunda línea de protección frente a la luz UV. Es el órgano más extenso del cuerpo humano y

estructuralmente está formado por tres capas diferenciadas denominadas epidermis, dermis y tejido subcutáneo (16). El efecto de la radiación UV en la piel no es uniforme. Así, la radiación UVB de mayor energía presenta una baja penetración y alcanza sólo a la epidermis debido a su absorción por parte de los pigmentos cutáneos y otros componentes celulares (ácidos nucleicos y proteínas) de queratinocitos, melanocitos y células de Langerhans (17). Por su parte, la radiación UVA y VIS tienen un menor contenido energético que la radiación UVB y son capaces de alcanzar capas más profundas, llegando a la dermis, la cual está constituida por fibroblastos y células del sistema inmune como macrófagos, mastocitos, linfocitos y células dendríticas (18). Aunque las radiaciones UVA y VIS no tienen la capacidad de interactuar directamente con las biomoléculas esenciales de la célula tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, éstas pueden verse afectadas de una forma indirecta como se explicará a continuación.

1.2. Procesos fotofísicos y fotoquímicos de moléculas.

Según la Ley Grotthus-Draper, sólo aquella radiación que es absorbida puede iniciar los procesos fotoquímicos y fotobiológicos (19). En fotoquímica, se define como grupo cromóforo al conjunto de átomos de una molécula con la capacidad de absorber radiación UV/VIS de una determinada λ (13). La región del espectro en la que absorbe una molécula dependerá de su estructura química, es decir, de la disposición en el espacio de sus átomos y sus electrones asociados. De esta forma, existen cromóforos que absorben radiación de una única región del espectro, otros que pueden absorber en varias regiones (UVB-UVA o UVA-VIS) y algunos presentan un espectro más amplio, incluyendo varias regiones del espectro UV y el espectro VIS (20).

Una vez que los fotones de la radiación UV/VIS han penetrado en la piel, éstos pueden ser absorbidos por cromóforos endógenos, es decir, aquellos propios de la piel como los ácidos nucleicos, proteínas, melaninas, ácido urocánico, riboflavinas, carotenoides, bilirrubinas o porfirinas (20-23). Además, algunos fármacos (sistémicos y de aplicación tópica), cosméticos, fragancias, aditivos, colorantes y otros agentes xenobióticos presentes en el ambiente, pueden acumularse en la piel y absorber la radiación UV/VIS, actuando como cromóforos exógenos (24-28).

En condiciones basales, las moléculas con grupos cromóforos se encuentran en estado fundamental (S_0), con un nivel mínimo de energía. Después de absorber un fotón, en la molécula se produce una transición electrónica a orbitales de mayor energía y alcanza un estado excitado singlete (S_N), que es inestable. Para regresar a S_0 , la molécula debe liberar el exceso de energía y existen varias rutas de desactivación, según se muestra en el Diagrama de Jablonski (Figura 1.3):

(A) **Procesos fotoquímicos**, que implican la reorganización de los enlaces químicos de la molécula desde su estado excitado dando lugar a una estructura distinta a la original.

(B) **Procesos fotofísicos**, en los que únicamente hay cambios en los estados cuánticos de la molécula y no en su estructura química. Estos tienen lugar entre estados excitados de diferente nivel energético o entre un estado excitado y el S_0 . Se pueden clasificar en procesos radiantes o no radiantes en función de si la desactivación lleva asociada emisión de radiación electromagnética.

Los procesos fotofísicos radiantes más frecuentes en las moléculas son la emisión de fluorescencia, que consiste en la desactivación desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1) hasta el S_0 , y la fosforescencia, desde el primer estado excitado triplete (T_1) hasta S_0 , de menor intensidad que la fluorescencia. Respecto a los procesos fotofísicos no radiantes, se pueden citar los procesos de conversión interna (CI) o de liberación de energía a las moléculas vecinas en forma de calor produciendo relajaciones vibracionales (RV), y el cruce de intersistemas (CIS), en el que se genera el estado excitado triplete (T_N) a partir del S_1 , diferenciándose en el spin del último par de electrones (13).

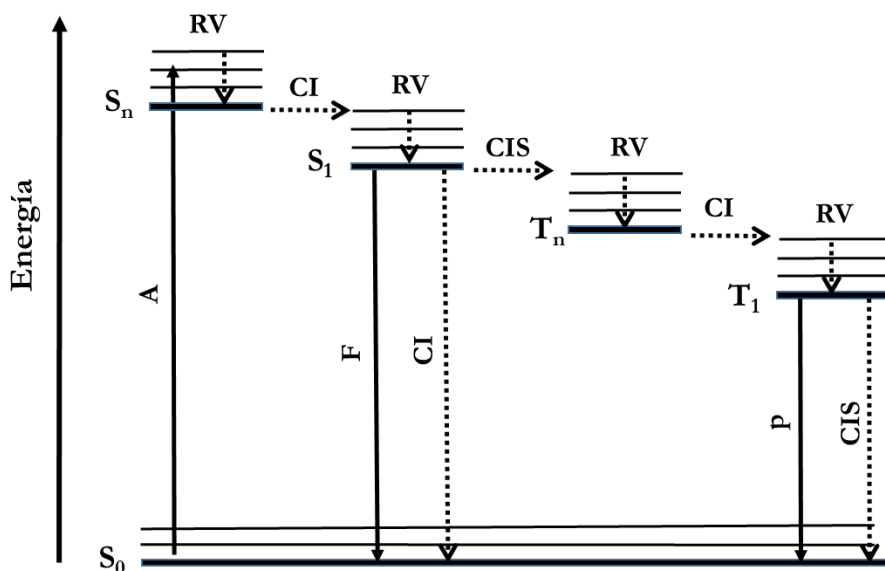


Figura 1.3. Diagrama de Jablonsky modificado de los niveles energéticos de una molécula tras la absorción (A) de radiación: Singlete (S) y triplete (T) y las rutas de desactivación: Fluorescencia (F), Fosforescencia (P), Conversión interna (CI), Cruce de intersistemas (CIS) y Relajación vibracional (RV). Las flechas continuas indican procesos fotofísicos radiantes y las discontinuas, procesos no radiantes.

1.3. Procesos de fotosensibilización a biomoléculas.

La radiación UVB puede provocar un daño directo a las biomoléculas por interacción con las bases nitrogenadas del ADN y ARN (29); así como a aminoácidos aromáticos como el triptófano o la tirosina (30) o a los lípidos de membrana como el ácido linoleico (31). Por el contrario, la radiación UVA no es capaz de generar tales efectos por interacción directa debido a su menor nivel energético. Sin embargo, la radiación UVA podría ser igualmente perjudicial, actuando de forma indirecta a través de los procesos de fotosensibilización (32).

La fotosensibilización es el proceso por el que una especie química sufre una alteración fotofísica o fotoquímica como resultado de la absorción inicial de radiación de otra especie química denominada fotosensibilizador (FS) (33). Desde el punto de vista fotobiológico, la región del espectro UV que tiene un papel más relevante en los procesos de fotosensibilización es la radiación UVA, siendo menos frecuentes la producida por radiación UVB (provoca daño directo) y por radiación VIS (debido a una menor energía asociada). Tanto los cromóforos endógenos (34-36) como los exógenos (37-40) que absorban la radiación UVA con la eficiencia suficiente pueden actuar en la piel como FS, convirtiendo una λ de baja energía en un agente dañino al transferir el FS la energía absorbida hasta las biomoléculas de la célula.

Los FS se pueden clasificar en dos grandes grupos, en función del mecanismo implicado en la fotosensibilización, (41):

(A) **Fotosensibilizador Tipo I:** Su estado excitado induce un proceso de transferencia de carga o de energía al aceptor, lo que puede dar lugar a la formación de diferentes tipos de lesiones en las biomoléculas.

(B) **Fotosensibilizador Tipo II:** Su estado T_1 transfiere la energía al oxígeno molecular para la formación del oxígeno singlete (1O_2), que es un agente oxidante muy reactivo que podría generar daño a las biomoléculas.

En la Figura 1.4 se resumen las lesiones más frecuentes a las biomoléculas que tienen lugar en los procesos de fotosensibilización celular.

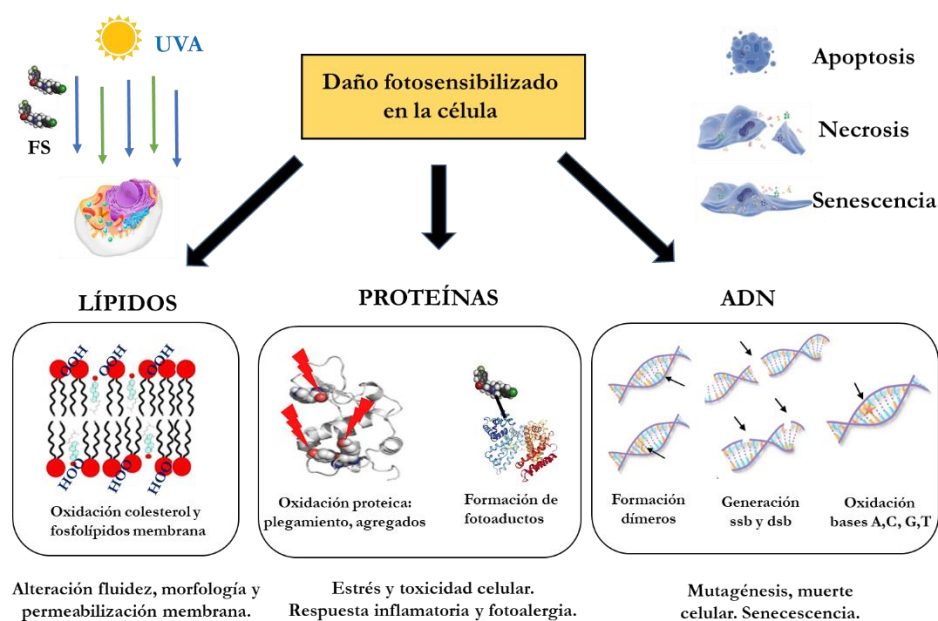


Figura 1.4. Procesos de fotosensibilización a biomoléculas a nivel celular.

Con respecto a los lípidos, los radicales libres que se pueden formar a partir de un mecanismo tipo I provocan la oxidación del colesterol (42) y de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana plasmática, formando hidroperóxido. Como consecuencia, se altera la morfología y fluidez de la bicapa lipídica, incrementándose su área y disminuyendo su grosor (43, 44). Además, el proceso oxidativo de los ácidos grasos genera aldehídos truncados que favorecen la permeabilización de la membrana plasmática celular (45).

La fotooxidación de las proteínas tiene lugar principalmente por acción de $^1\text{O}_2$ (46), aunque también es posible la existencia del mecanismo tipo I. En particular, sólo los aminoácidos histidina, triptófano, cisteína, metionina y tirosina pueden sufrir procesos oxidativos (30). La oxidación puede alterar la conformación tridimensional de la proteína afectada (47), su funcionalidad (48, 49) o generar agregados tóxicos para la célula (50). Por otra parte, en determinados procesos de fotosensibilización, se puede producir la fotounión covalente entre el FS y su proteína diana, formándose un fotoaducto, que será el desencadenante de las reacciones de fotoalergia (51).

El daño fotosensibilizado al ADN también se denomina indistintamente en la bibliografía como fotogenotoxicidad (52, 53). Determinados FS provocan la formación de dímeros de timina mediante una transferencia de energía directa del FS en el estado excitado T_1 (54). Por otra parte, otro tipo de daño muy frecuente en el ADN consiste en las oxidaciones de bases nitrogenadas como la de guanina y timina, para la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) o de timina glicol (35, 55), respectivamente. Por último, también se puede producir la rotura del enlace fosfodiéster en una

de las dos cadenas de ADN, con la siguiente formación de cortes de cadena simple (SSB) por parte del radical OH (35, 56), siendo menos habituales y frecuentes los cortes de doble cadena (DSB).

Cabe destacar que no todos los FS producen el mismo tipo de daño en la célula y afectan a los mismos tipos celulares. Para aquellos FS que se aplican vía tópica, los queratinocitos son la principal célula diana porque el FS se suele acumular en la capa más externa de la piel. Los fármacos que se administran vía oral o parenteral suelen actuar sobre capas más profundas de la piel, y los fibroblastos o células endoteliales de la dermis son los linajes celulares más afectados por el proceso de fotosensibilización. En el interior celular, cada FS genera un perfil de daño propio debido a las características de absorción de radiación UV del cromóforo y de otras propiedades fisicoquímicas, que pueden condicionar su fotorreactividad, su localización en algún orgánulo de la célula y la afinidad relativa por las diferentes biomoléculas. Como normal general, los FS hidrofílicos tienen una mayor preferencia por producir daño en las membranas plasmáticas, y aquellos FS hidrofóbicos, que son capaces de difundir en el interior celular, pueden tener también la capacidad de producir el daño en el citoplasma e incluso llegar al núcleo celular y provocar fotogenotoxicidad (25).

Las rutas de señalización en la célula que se activan en respuesta a un FS van a ser dependientes del perfil de daño que un FS genera y de su magnitud, con el objetivo último de preservar su homeostasis interna.

La oxidación a niveles moderados de lípidos y proteínas induce la expresión de numerosas enzimas antioxidantes. Algunas de las más estudiadas son la enzima glutatión peroxidasa, tiorredoxinas o sulforredoxinas, todas ellas

reguladas por el factor de transcripción Nrf2 (57, 58). En el caso de producirse una oxidación irreversible de la proteína o la formación de agregados proteicos con pérdida de su función, las proteínas serán hidrolizadas bien a través de sistema ubiquitina-proteasoma o bien a través del lisosoma (59). Si el nivel de oxidación es más elevado, se producirá una parada en el ciclo celular, que puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o necroptosis cuando se alcanza un determinado umbral. Si el proceso de fotosensibilización genera una permeabilización indiscriminada de la membrana plasmática, se producirá la lisis completa de la célula, con la liberación del contenido citoplasmático y la pérdida de la homeostasis iónica (60). En este caso, el tipo de muerte será necrótica proinflamatoria, y provocará el reclutamiento de las células del sistema inmunitario innato como macrófagos y neutrófilos, responsables de los signos agudos observados sobre la piel como erupción cutánea, picazón, enrojecimiento y la aparición de ampollas.

Con respecto al daño fotosensibilizado al ADN, las células han desarrollado intrincados mecanismos de reparación endógenos (61), según el tipo de daño que se ha generado sobre la doble hélice del ADN (Figura 1.5).

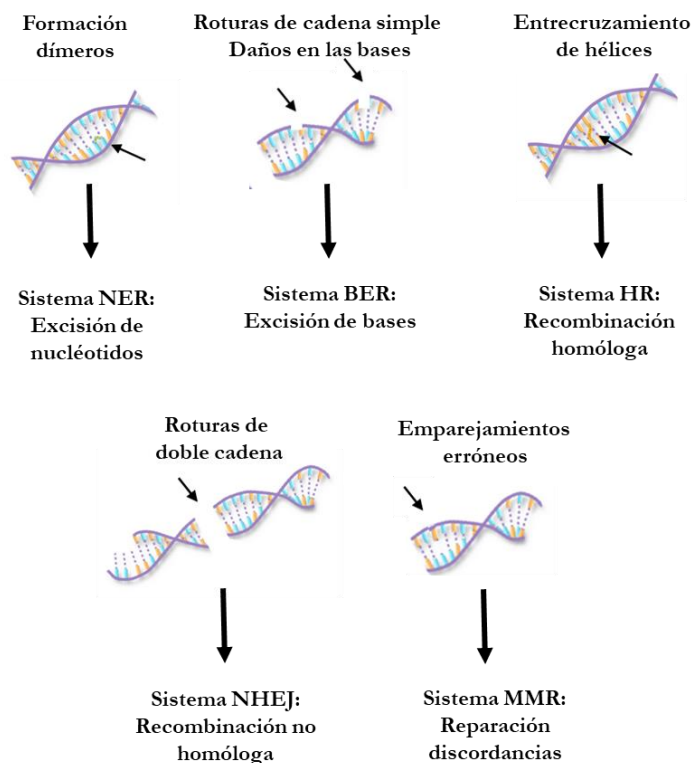


Figura 1.5. Principales mecanismos celulares de reparación del ADN dañado (61).

De los cinco mecanismos que se citan en la figura, los que más relevancia tienen en los procesos de fotosensibilización al ADN son:

(A) El sistema de reparación por escisión de bases (BER), responsable de la reparación de bases nitrogenadas oxidadas (62) y SSB (63).

(B) El sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), encargado de reparar la formación de dímeros de timina (64).

(C) El sistema de recombinación homóloga (HR), en el caso de que se produzca entrecruzamiento de bases intercatenario.

Si la reparación del daño no se realiza correctamente, puede dar lugar a la formación de una mutación en la posición del genoma donde se ha generado el daño (65). Una de las lesiones del ADN más mutagénicas es la 8-oxo-dG porque favorece la transversión de guanina a timina (66). La aparición de carcinogénesis puede verse favorecida por la acumulación de mutaciones en regiones codificantes y de regulación de la expresión, resultando en la activación de oncogenes que favorezcan el crecimiento celular desregulado o el silenciamiento de genes supresores, evadiendo los mecanismos de muerte celular (67, 68). Cuando el daño generado en el ADN alcanza un determinado umbral y la célula no es capaz de repararlo de forma eficiente, se produce una parada en el ciclo celular que puede dar lugar a fenómenos de envejecimiento celular y senescencia. Para evitar que una célula pueda acumular mutaciones que acaben desencadenando procesos cancerígenos, existen sistemas de control interno como el gen supresor p53, que son responsables de la activación de la ruta de muerte por apoptosis, en el que la familia de proteasas llamadas caspasas se encargan del desmantelamiento celular preservando la integridad de la membrana (69, 70).

1.4. Manifestaciones clínicas de la fotosensibilidad inducida por fármacos y su fotodiagnóstico.

Durante los últimos años, en la sociedad se ha observado una creciente exposición a la RS debido a los cambios en el estilo de vida, con un mayor desarrollo de actividades lúdicas al aire libre y el uso popularizado de las cabinas de bronceado. Como consecuencia, la incidencia de las reacciones de fotosensibilidad asociadas a fármacos, cosméticos y otros agentes xenobióticos se ha incrementado en la población y suponen hasta un 8 %

del total de reacciones cutáneas notificadas por fármacos (71) y un 5 % de los diagnósticos realizados en una unidad hospitalaria de fotobiología (72). La incidencia se concentra principalmente en los periodos estivales en los que hay un mayor índice UV. A pesar de estas cifras, obtener datos fiables sobre la incidencia real de la fotosensibilidad en la población resulta una tarea complicada ya que muchos casos clínicos son diagnosticados como una quemadura convencional (73).

Conforme al mecanismo fisiopatológico que subyace, las reacciones de fotosensibilidad inducidas por fármacos en la práctica clínica habitual se clasifican en: **reacciones de fototoxicidad** (incluyendo fotogenotoxicidad) y **reacciones de fotoalergia** (74-77). En ciertas ocasiones, determinar el tipo de respuesta provocada por un fármaco resulta complejo para los facultativos especialistas porque algunos pueden inducir ambos cuadros clínicos (78-80). Las características diferenciales entre la fototoxicidad y la fotoalergia vienen resumidas en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características diferenciales de las reacciones de fotosensibilidad inducidas por fármacos: fototoxicidad y fotoalergia.

	Fototoxicidad	Fotoalergia
Presentación clínica	Quemadura solar, eritema, edemas, hiperpigmentación	Dermatitis eczematosa
Distribución	Zonas expuestas a RS	Zonas expuestas a RS, y adyacentes
Fisiopatología	Daño tisular directo	Hipersensibilidad Tipo I Hipersensibilidad Tipo IV

Histología	Epidermis: Necrosis Dermis: Inflamación	Epidermis: Edema Dermis: Infiltrado linfocitos
Síntomas	1ª Exposición. Minutos/horas	2ª Exposición. 24 horas/48 horas
Dosis	Grandes dosis	Pequeñas dosis
Reactividad cruzada	No	Sí. Compuestos similares
Prevalencia	Común	Menos frecuente

Las reacciones de fototoxicidad presentan una mayor incidencia en la población y se manifiestan con rapidez después de la primera exposición combinada al fármaco a la radiación UV. Habitualmente cursan como un enrojecimiento exacerbado de la piel con edema e inflamación provocado por el daño tisular directo exclusivo en zonas fotoexpuestas de la piel como brazos, manos, escote o nuca. Por el contrario, las reacciones de fotoalergia son menos frecuentes y los síntomas suelen ser más tardíos en el tiempo desde la co-exposición. El mecanismo puede implicar una respuesta de hipersensibilidad de Tipo IV mediada por la activación de los linfocitos T iniciada por la unión covalente de un FS (o una especie derivada del mismo) a su proteína diana en presencia de luz UVA. En otras ocasiones, puede tratarse de una reacción de hipersensibilidad de tipo I mediada por IgE. En cualquier caso, en ambos casos se requiere de una primera co-exposición al fármaco y radiación UV para la generación de los anticuerpos. Además, puede existir reactividad cruzada entre compuestos con estructura química semejante (81). El cuadro clínico de las reacciones de fotoalergia es similar al de una dermatitis alérgica y aunque se manifiesta principalmente en zonas

del cuerpo fotoexpuestas, dichas lesiones pueden extenderse a regiones de la piel adyacentes no expuestas a la RS.

Ante la sospecha de una reacción de fotosensibilización producida por un fármaco, el facultativo especialista debe identificar el posible FS causante del cuadro clínico a través de la reconstrucción de la historia clínica. Se debe descartar la existencia de otras patologías que cursan con fotosensibilidad como las pseudoporfirias, o la hiperbilirrubinemia. Al diagnóstico final se llegará a través de las siguientes pruebas diagnósticas (74, 82):

(A) **Fototest:** Consiste en la exposición de la piel a una dosis conocida de luz del espectro UV/VIS y observar la respuesta producida (eritema, habón o pigmentación) en el tiempo establecido. Si el umbral de respuesta a la luz, es decir, su dosis eritematosa mínima (MED), está disminuido respecto a los valores de referencia para el tipo de piel del paciente, es indicativo de la existencia de fotosensibilidad (Figura 1.6A).

(B) **Fotoparche:** Es una técnica indicada en el diagnóstico de la fotoalergia por contacto y consiste en la aplicación en la espalda de parches con los alérgenos sospechosos por duplicado. Una de las series permanece en oscuridad y la otra es irradiada con luz UVA. Por último, se comparan las reacciones cutáneas producidas en ambas series y la presencia de reacción cutánea en la región irradiada y su ausencia en la región no irradiada es indicativo de la existencia de una reacción fotoalérgica (Figura 1.6B).

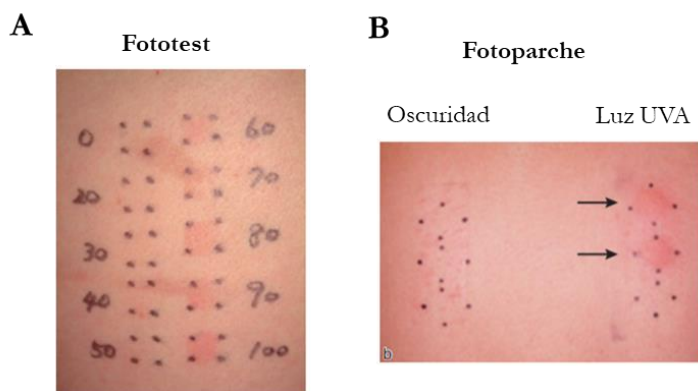


Figura 1.6. (A) Fototest para determinar la existencia de fotosensibilidad en la piel. El eritema aparece a partir de una dosis de 60 mJ/cm². (B) Fotoparche para el diagnóstico de la fotoalergia. Las flechas indican la existencia de reacción cutánea únicamente en la serie del alérgeno sometida a irradiación UVA (83).

Con respecto al tratamiento de las reacciones de fototoxicidad o fotoalergia, una vez diagnosticadas en el paciente, en primer lugar, se debe producir la discontinuidad del tratamiento y si es posible su sustitución por otro fármaco equivalente que no produzca fotosensibilidad. Si debido a la gravedad de la patología, no es posible el reemplazo del fármaco que actúa como FS, las medidas de fotoprotección son esenciales. Así, se debe favorecer el uso de textiles de colores oscuros que cubran la mayor parte del cuerpo incluyendo gorras y gafas de sol, y la aplicación de fotoprotectores tópicos y evitar la exposición a la RS en las horas de máximo índice UV. Para el tratamiento de los síntomas agudos, los corticoesteroides tópicos son el fármaco de primera elección junto con los antihistamínicos. Para los casos graves, se recomienda el uso de corticoesteroides sistémicos como la prednisona (77, 84).

1.5. Familias de fármacos con capacidad fotosensibilizante.

Los fenómenos de fotosensibilidad asociados a un fármaco son una reacción adversa potencialmente grave y cada vez son más frecuentes en la población. Así, la calidad de vida de las personas que la padecen se ve disminuida, y si no se diagnostican de una forma correcta con la suficiente antelación pueden ser en última instancia los causantes de la aparición de carcinomas en la piel (68, 85-87). Por estas razones, la fotosensibilidad inducida por fármacos representa en la actualidad un importante problema de salud pública al que los sistemas sanitarios se deben enfrentar.

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) estadounidense y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) han reconocido el problema asociado a la fotoseguridad de determinados fármacos existentes en el mercado y de las nuevas entidades que se aprueban anualmente para su comercialización. En consecuencia, se han desarrollado guías técnicas, las cuales incluyen un conjunto de directrices y metodologías experimentales de obligado cumplimiento por las empresas farmacéuticas que desean comercializar un nuevo compuesto que tenga capacidad fotosensibilizante (88-92). Dichas guías se encuentran sometidas a revisión permanente para incorporar los nuevos conocimientos generados y, en ellas, se evalúan las siguientes características para determinar si un fármaco puede presentar capacidad fotosensibilizante:

(A) Absorción de la luz en el rango de la RS (290 nm -700 nm) (93).

(B) Generación de especies reactivas bajo exposición a luz UV/VIS (94).

(C) Distribución eficiente a tejidos fotoexpuestos: piel, ojos (95).

Con una exhaustiva búsqueda bibliográfica, unos 400 fármacos han sido identificados por presentar entre sus reacciones adversas, fenómenos de fotosensibilidad (73, 96-99). La Figura 1.7 muestra la estructura química de algunos de los fármacos fotosensibilizantes más estudiados y en la Tabla 1.2 los mecanismos químicos y celulares subyacentes a la fotosensibilidad. A pesar de las características comunes citadas previamente, a priori no se puede predecir de una forma inmediata si un fármaco va a producir reacciones de fotosensibilidad. De hecho, fármacos de la misma familia, que comparten el grupo farmacóforo, pueden diferir en sus propiedades fotosensibilizantes como ocurre con las fluoroquinolonas (53, 100). En este caso, se ha demostrado que el factor determinante en la fototoxicidad inducida por esta familia es la halogenación en la posición C8. Así, la lomefloxacin (LMX) y la esparfloxacin, que presentan un átomo de flúor en esa posición tienen propiedades fotosensibilizantes más elevadas que la moxifloxacin, que posee un grupo metoxilo como sustituyente (101, 102).

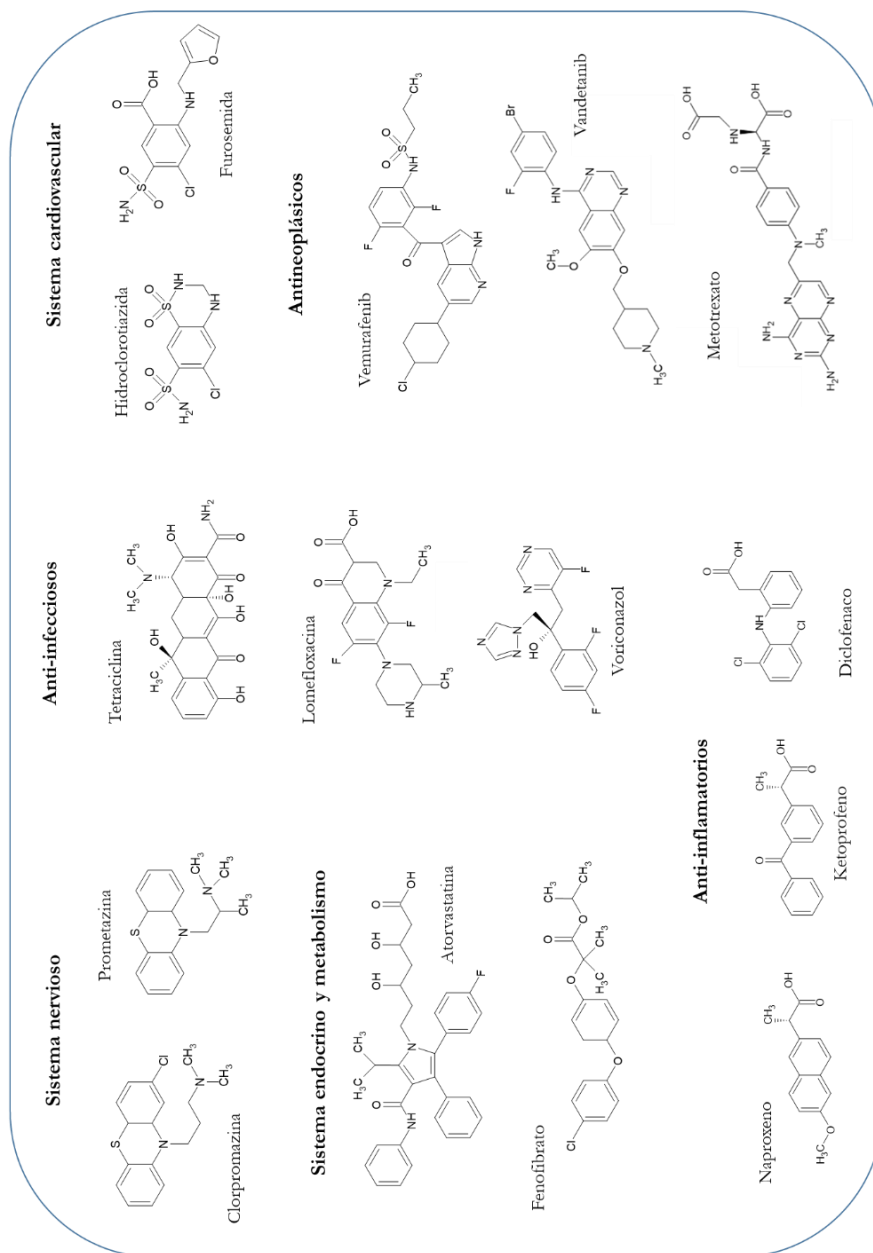


Figura 1.7. Estructura química de los fármacos con capacidad fotosensibilizante agrupados por su funcionalidad.

Tabla 1.2. Revisión bibliográfica de los mecanismos celulares y moleculares de fotosensibilidad asociados a fármacos.

Fármacos del sistema nervioso		
Clorpromazina	Generación de radicales libres y estado excitado triplete	(103-106)
Prometazina	Fototoxicidad fibroblastos y queratinocitos Fotogenotoxicidad y oxidación lípidos membrana.	
Agentes anti-infecciosos		
Tetraciclinas	Generación de oxígeno singlete y anión superóxido Fototoxicidad fibroblastos y melanocitos	(107-109)
Fluoroquinolonas	Generación de intermediarios reactivos (catión arilo) Fototoxicidad y fotogenotoxicidad: oxidación guanina	(102, 110, 111)
Voriconazol	Generación oxígeno singlete derivado hidroxilado	(112)
Fármacos del sistema cardiovascular		
Hidroclorotiazida	Generación de radicales libres Fototoxicidad queratinocitos Fotogenotoxicidad: formación dímeros de timina	(54, 113, 114)
Furosemida	Generación de oxígeno singlete Fototoxicidad: oxidación ADN y lípidos membrana Fotoalergia: generación aductos covalentes	(114-116)
Fármacos del sistema endocrino y metabolismo		
Estatinas	Generación de fotoproductos que actúan como fotosensibilizadores Fototoxicidad. Oxidación lípidos y proteínas	(60, 117-119)
Fenofibrato	Generación de oxígeno singlete Fototoxicidad: oxidación lípidos Fotoalergia: formación fotoaductos HSA	(40, 120, 121)
Fármacos anti-inflamatorios		
Ketoprofeno	Generación de oxígeno singlete y otras especies reactivas.	(121-124)
Naproxeno	Fototoxicidad: oxidación lípidos, proteínas. Fotoalergia: reacción cruzada entre el ketoprofeno, el ácido tiaprofénico, fenofibrato y octocrileno	
Fármacos antineoplásicos		
Metotrexato	Generación de fotoproducto que actúa como fotosensibilizante a través de la transferencia de electrones Fototoxicidad y fotogenotoxicidad	(125, 126)
Vandetanib	Generación de intermedio reactivo (radical arilo) Fototoxicidad: oxidación lípidos, proteínas y fotogenotoxicidad	(70)
Vemurafenib	Fototoxicidad indirecta por acumulación de porfirinas.	(127)

Los fármacos fotosensibilizantes principalmente han sido estudiados desde un punto de vista médico a través del estudio de los casos y series clínicas de pacientes, y también, desde el punto de vista molecular, caracterizando los procesos fotofísicos y/o fotoquímicos que tienen lugar una vez que el fármaco ha absorbido la radiación UV. Menor ha sido la caracterización de los procesos de fotosensibilización por fármacos y del daño fotoinducido hacia las biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN en el ambiente celular. En parte, este hecho probablemente que sea debido a la dificultad técnica para estandarizar los ensayos *in vitro* con células vivas.

A continuación, se exponen los fundamentos de los ensayos celulares más utilizados por la comunidad científica para investigar sobre los procesos de fotosensibilización por fármacos. Con respecto a los linajes celulares de elección para el desarrollo de los experimentos, destacan las líneas celulares de fibroblastos de ratón (NIH-3T3) y humanos (BJ) representativos de la dermis (128, 129), así como las líneas de queratinocitos como HaCaT, modelo de la capa más superficial de la piel (epidermis)(103).

Ensayo de citotoxicidad. Es uno de los métodos más frecuentes para identificar aquellos fármacos con capacidad fotosensibilizante. Está basado en el estudio comparativo de la viabilidad celular de células derivadas de piel tratadas con el fármaco a estudio seguido de una exposición controlada a luz UV o mantenidas en oscuridad. La viabilidad celular se analiza mediante el ensayo de actividad metabólica celular con el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5,-difetil tetrazolio (MTT) o la acumulación de rojo neutro en forma catiónica en los lisosomas de aquellas células vivas (130). Una disminución de la viabilidad celular en las células tratadas con el fármaco y sometidas a luz UV será indicativo de fototoxicidad. La principal

desventaja de este ensayo es que no permite obtener información acerca del mecanismo ni el tipo de biomoléculas implicadas en el daño. Existen alternativas y variaciones en la configuración de los experimentos de citotoxicidad, por lo que la OCDE llevó a cabo su estandarización mediante la elaboración de la Guía 432 (131), lo que facilita la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes laboratorios expertos en el campo.

Ensayos de fotogenotoxicidad. Permiten evaluar la capacidad de un fármaco para inducir daño en el ADN cromosómico en las células en cultivo cuando se exponen a la luz UV. Existen en la bibliografía varios ensayos para el estudio de la fotogenotoxicidad en células (52). Algunos de los más utilizados son el ensayo de formación de micronúcleos (53), que son pequeñas estructuras que se forman en las células como consecuencia del daño cromosómico, o el ensayo *comet*, también denominado ensayo de electroforesis de célula individual, en el que se mide la cantidad de daño al ADN en cada célula tras la realización de una electroforesis en minigeles de agarosa (132) y su visualización mediante microscopía de fluorescencia tras la incubación con un agente intercalante del ADN. Para el desarrollo de esta tesis, se ha seleccionado el ensayo *comet* para su puesta a punto y poder evaluar así el daño fotoinducido al ADN por fármacos.

Ensayos de oxidación de lípidos y proteínas. Consisten en medir la formación de peróxidos lipídicos y de proteínas oxidadas en las células expuestas al fármaco a estudio e irradiadas con luz UV. Así, la cromatografía líquida de alta resolución permite la cuantificación de productos de peroxidación lipídica como el malondialdehído (58). Otra técnica muy utilizada es el uso de lípidos fluorescentes que pueden incorporarse a las membranas celulares y medir su estado de oxidación mediante microscopía

de fluorescencia (133). La fotooxidación de proteínas en el ambiente celular en los procesos de fotosensibilización ha sido menos estudiada, por lo que los ensayos disponibles no están estandarizados. Así, ensayos colorimétricos por derivatización de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) permiten la cuantificación de grupos carbonilos formados en aquellas proteínas que han sufrido procesos de oxidación (134). Finalmente, otra estrategia consiste en la inmunodetección de proteínas oxidadas con el uso de anticuerpos específicos (135).

La combinación de resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, de fotogenotoxicidad, de oxidación de lípidos y proteínas, junto con otros ensayos complementarios como la expresión de genes relacionados con la respuesta celular a radiación UV, van a permitir una mejor caracterización de los mecanismos subyacentes de fotosensibilización por fármacos en las células, los cuáles no se conocen con precisión para la mayoría de los fármacos fotosensibilizantes descritos.

1.6. Implicación del metabolismo de fármacos en las reacciones de fotosensibilidad.

El metabolismo de un fármaco se define como el conjunto de reacciones bioquímicas o de biotransformación encaminadas a modificar su estructura química para favorecer su eliminación del organismo. El hígado, los riñones y el intestino son los principales órganos del cuerpo humano donde se metabolizan los fármacos (136), aunque las últimas investigaciones indican que la piel, y particularmente, los queratinocitos de la epidermis también poseen dicha capacidad de biotransformación (137, 138).

El proceso de biotransformación de un fármaco puede dividirse en 2 fases diferenciadas, y viene esquematizado en la Figura 1.8 (136):

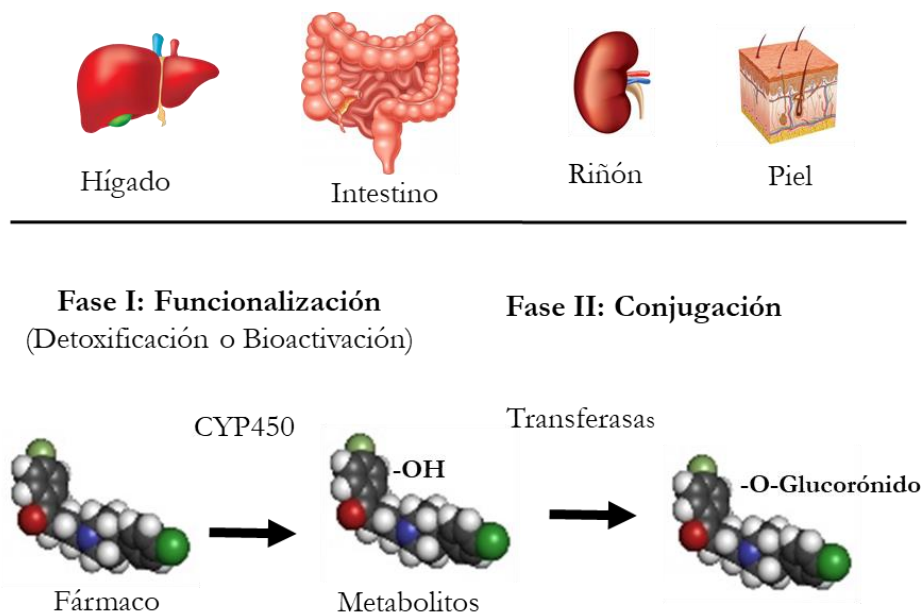


Figura 1.8. Esquema general del metabolismo de fármacos.

(A) Metabolismo Fase I: El fármaco modifica su estructura química con la aparición o eliminación de algún grupo funcional. Las principales reacciones que ocurren en esta fase son de oxidación (hidroxilaciones, desalquilaciones o deshalogenaciones), de reducción o de hidrólisis. Estas reacciones son catalizadas principalmente por la familia de citocromos P450 y en menor medida por las enzimas flavín monooxigenasas. En particular, la familia de citocromos P450 consta de unos 50 miembros, y de entre ellos, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 son los de mayor relevancia en la metabolización de fármacos (139).

(B) Metabolismo Fase II: El fármaco original o un metabolito generado en la Fase I se conjuga con grupos endógenos que aportan hidrofiliidad como el ácido glucorónico, o aminoácidos como la glicina, glutatión o el grupo sulfato. Las principales enzimas que participan en esta fase del metabolismo son entre otras las enzimas UDP-glucuroniltransferasas, sulfotransferasas, N-acetiltransferasas o glutatión S-transferasas.

Como regla general, el metabolismo convierte fármacos liposolubles en compuestos más hidrofílicos y de una mayor hidrosolubilidad para que se pueden excretar del organismo vía renal o biliar-fecal con mayor facilidad, y con ello disminuir su potencial tóxico. Sin embargo, en determinadas situaciones los metabolitos generados tienen mayor electrofilia, resultando por tanto más reactivos que el fármaco original y reaccionando así con las biomoléculas presentes en las células, bien produciendo su oxidación o uniéndose covalentemente, resultando finalmente en un daño celular.

Con respecto a aquellos fármacos que pueden actuar como FS, en la mayoría de las ocasiones sus metabolitos comparten las mismas propiedades de su cromóforo y, por tanto, mantienen su capacidad fotosensibilizadora. En cambio, otras veces, el proceso de funcionalización puede generar un nuevo cromóforo, carente en el fármaco original, o modificar las propiedades de éste, disminuyendo o incrementando su actividad fotobiológica. Algunos de los factores por los que un metabolito puede mostrar una mayor fotosensibilidad con respecto a su fármaco original son las siguientes: (A) un desplazamiento batocrómico de la absorción hacia las regiones UVA y VIS, aumentando así la fracción de RS que puede producir fotosensibilidad; (B) la modificación de las propiedades de los diferentes estados excitados; (C) mayor capacidad de producir ROS; (D) cambios en las afinidades

relativas por las diferentes biomoléculas, en especial proteínas de transporte y ADN; (E) un mayor grado de funcionalización que hace aumentar la probabilidad de formación de fotoaductos con biomoléculas.

En este contexto, se plantea la hipótesis de que metabolitos de un fármaco pudieran ser también responsables, en parte o totalmente, de los fenómenos de fotosensibilidad observados. Sin embargo, en la industria farmacéutica, las propiedades fotosensibilizantes de los metabolitos de un fármaco no son analizadas y tienden a pasar desapercibidos porque no es obligatorio su análisis. Así, existen pocos estudios de fotosensibilidad de fármacos que contemplen el análisis de los metabolitos (140, 141) y la gran mayoría de los que se han realizado a nivel celular carecen de este enfoque. Por estas razones, se precisa del desarrollo de nuevas investigaciones que permitan identificar los metabolitos fotorreactivos de fármacos fotosensibilizantes y esclarecer su grado de contribución al proceso de fotosensibilidad.

Capítulo 2. Objetivos

Los fenómenos de fotosensibilidad asociados a fármacos se consideran en la actualidad como reacciones adversas, cuya incidencia en la población ha aumentado notablemente por una mayor exposición a la radiación UV. Dado su gran impacto en la salud, las principales agencias regulatorias del medicamento (FDA, EMEA) han elaborado guías para evaluar los riesgos fotobiológicos de aquellos fármacos que puedan actuar como agentes fotosensibilizantes. Sin embargo, en ellas no se ha tenido en consideración la biotransformación que sufren los fármacos tras su administración, ya que se pueden generar metabolitos reactivos que también pueden contribuir al daño fotosensibilizado. Generalmente, estos fenómenos se han investigado a nivel químico y clínico, sin embargo, los estudios a nivel celular son más limitados. Esto puede atribuirse a la dificultad técnica para estandarizar ensayos celulares que permitan estudiar las reacciones de fototoxicidad, incluyendo la fotogenotoxicidad.

El objetivo general de la presente tesis es estudiar las reacciones adversas de fotosensibilidad *in vitro* asociadas a fármacos utilizados en la práctica clínica habitual para el tratamiento de enfermedades graves y de alta prevalencia. Así, los fármacos objeto de estudio en esta tesis doctoral son el antiinflamatorio no esteroideo diclofenaco (DCF), el anticancerígeno lapatinib (LAP), el antiviral simeprevir (SIM) y el ansiolítico clorpromazina (CPZ); éstos han sido seleccionados en base a una búsqueda bibliográfica previa ya que presentan propiedades fotosensibilizantes. Se investigará además la potencial foto(geno)tóxico de los metabolitos fotorreactivos de los fármacos. Así, se estudiará en detalle los fenómenos de fototoxicidad, fotogenotoxicidad y su relación con la fotomutagenicidad mediante técnicas de biología celular y molecular. Con esta tesis se espera generar nuevos

conocimientos sobre los mecanismos biológicos y químicos relacionados con los procesos de fotosensibilidad.

Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificar nuevos fármacos con propiedades fotosensibilizantes mediante una exhaustiva búsqueda bibliográfica.
- 2) Determinar el riesgo fotogenotóxico de los fármacos seleccionados mediante técnicas de biología molecular y celular, y estudiar la relación con la fotomutagenicidad.
- 3) Comparar la fototoxicidad y la fotogenotoxicidad de los fármacos con respecto a sus metabolitos más relevantes.
- 4) Evaluar la posibilidad de que fármacos carentes de propiedades fotosensibilizantes *in vitro* se conviertan de manera efectiva en metabolitos fotoactivos.
- 5) Investigar el daño fotosensibilizado por los fármacos y sus principales metabolitos hacia biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN.

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Selección de los fármacos a estudio.

La selección de los fármacos objeto de estudio de la presente tesis doctoral se realizó tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica en diferentes bases de datos (PubMed, Scopus, Web of Science) siguiendo los siguientes criterios de selección: (I) uso en la práctica clínica habitual para el tratamiento de enfermedades relevantes y frecuentes en la población (cáncer, procesos inflamatorios, infecciones virales, etc.); (II) capacidad del fármaco para absorber la RS en la región UV/VIS; (III) eficiente biodistribución del fármaco en la piel o en otras regiones del cuerpo expuestas al sol y (IV) existencia de casos clínicos con la evidencia de presentar propiedades fotosensibilizantes. En base a estos criterios, los fármacos seleccionados fueron diclofenaco (DCF), etretinato, lapatinib (LAP), simeprevir (SIM), sorafenib y sunitinib. Como cribado inicial para discriminar entre los que presentaban propiedades fotosensibilizantes de los que no, se realizó el ensayo celular de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU, en el que se evalúa el potencial fototóxico de un compuesto comparando la viabilidad celular en oscuridad o tras su irradiación con luz UVA, siguiendo la metodología que se describirá a continuación en la Sección 3.4. En la Figura 3.1 y la Tabla 3.1 se muestran sus estructuras químicas, la información acerca de su uso terapéutico, y el resultado obtenido del ensayo de fototoxicidad. De los seis fármacos, resultaron fototóxicos el diclofenaco, el lapatinib y el simeprevir. Además de estos fármacos, la clorpromazina fue incluida en esta tesis para caracterizar en mayor profundidad a nivel celular su fotogenotoxicidad, la cual ha sido previamente estudiada en nuestro grupo de investigación (106).

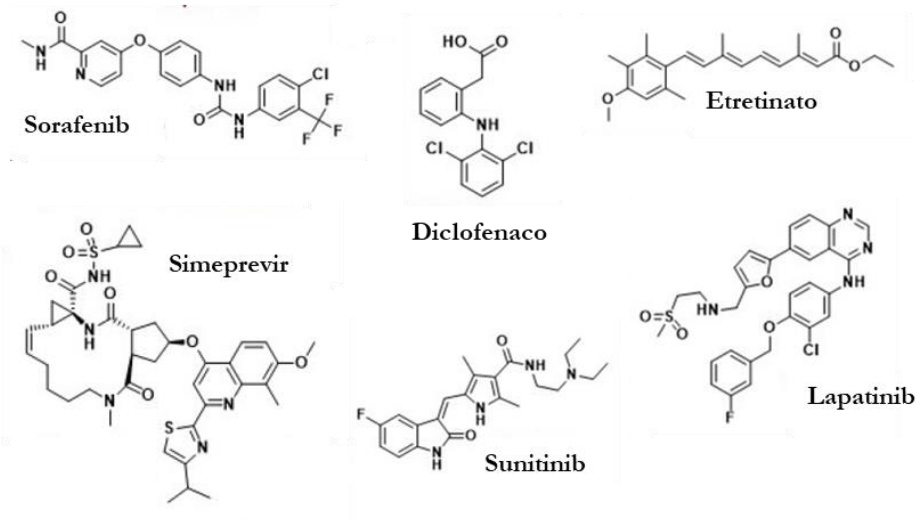


Figura 3.1. Estructuras químicas de los fármacos objeto de estudio.

Tabla 3.1. Información sobre los fármacos objeto de estudio.

Fármaco	Familia	Usos	Ensayo NRU
Diclofenaco	Aril-propiónico	Antiinflamatorio, Analgésico	Positivo
Etretinato	Retinoide aromático	Psoriasis	Negativo
Lapatinib	Inhibidor tirosina quinasa	Cáncer de mama	Positivo
Simeprevir	Inhibidor serina-proteasa NS3/4A	Hepatitis C	Positivo
Sorafenib	Inhibidor multiquinasa	Carcinoma renal y hepatocelular	Negativo
Sunitinib	Inhibidor tirosina-quinasa	Carcinoma gástrico, renal y pancreático	Negativo

3.2. Instrumentación general.

La irradiación de los fármacos y sus principales metabolitos se llevó a cabo con un fotorreactor modelo LZC-4 (Luzchem) que está provisto de ocho lámparas laterales y seis superiores, como se puede observar en la Figura 3.2. Estas lámparas emiten radiación en el rango de longitudes de onda (λ) comprendidos entre 300 nm - 400 nm (94 % radiación UVA, 2 % radiación UVB), siguiendo una distribución Gaussiana con un máximo centrado en 350 nm. La irradiancia en el interior del fotorreactor, referida a la región UVA del espectro, se determinó midiendo el nivel de luminosidad de las lámparas en funcionamiento mediante un luxómetro e interpolando el valor obtenido en la curva de calibrado proporcionada por el fabricante. El valor obtenido fue aproximadamente de 7 mW/cm².



Figura 3.2. Fotorreactor modelo LZC-4 (Luzchem).

Con el fin de mantener la esterilidad de los cultivos celulares, la irradiación en todos los casos se realizó a través de la tapa de las placas multipocillo utilizadas para los ensayos. El plástico de éstas absorbe la radiación UVB por debajo de 310 nm, lo que contribuyó a mitigar el posible daño directo de la radiación UVB en las biomoléculas de la célula. Además, para evitar el

sobrecalentamiento de las muestras, las placas se mantuvieron en hielo durante todo el tiempo que duró la irradiación.

Las dosis requeridas de radiación UVA estuvieron comprendidas entre 2.5 J/cm² y 15 J/cm² según se detalla para cada uno de los experimentos llevados a cabo. Los valores son comparables a las dosis de radiación UVA medidas en el transcurso de la realización de actividades al aire libre en verano al mediodía (92). El tiempo de irradiación necesario para alcanzar la dosis UVA deseada se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Tiempo irradiación (min)} = \frac{1000 \times \text{Dosis UVA (J/cm}^2\text{)}}{60 \times \text{Irradiancia (mW/cm}^2\text{)}}$$

Los **espectros de absorción** de los fármacos y metabolitos se registraron en un espectrofotómetro UV/Vis modelo UV-1800 (Shimadzu). Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente con el uso de cubetas de cuarzo (Hellma Analytics) de 1 cm de paso óptico y 3.5 mL de capacidad abarcando un rango de λ entre 200 nm y 700 nm.

Los **espectros de emisión de fluorescencia** se registraron en el espectrofluorímetro de placas Synergy H1 (Biotek) sobre placas de 96 pocillos de fondo oscuro y evitar así, las posibles interferencias de las medidas realizadas entre los pocillos adyacentes.

3.3. Técnicas de cultivos celulares.

Los cultivos celulares utilizados en este trabajo fueron la línea celular 3T3 de fibroblastos embrionarios de ratón Balb/c y el cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos (células FSK), que se adquirieron de la

Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Ambos cultivos son adherentes y crecen formando una monocapa. Como se observa en las imágenes de microscopía de contraste de fases realizadas con un microscopio invertido Leica DMi1 en la Figura 3.3, ambas células 3T3 y FSK presentan una morfología con forma de huso, así como prolongaciones citoplasmáticas relativamente ramificadas, más acentuadas en el caso de las células FSK, mediante las cuales establecen las interacciones célula-célula.

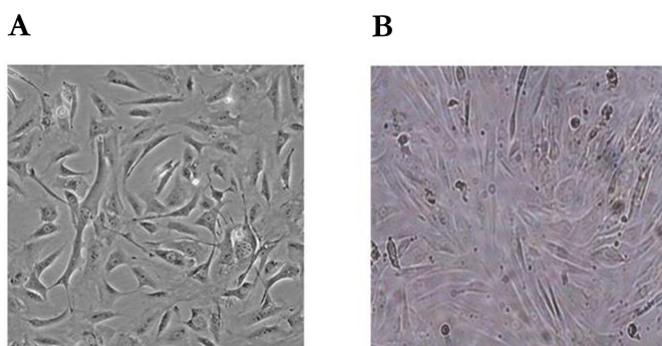


Figura 3.3. Morfología de los cultivos celulares en confluencia. (A) Línea celular de fibroblastos de ratón 3T3. (B) Fibroblastos dérmicos humanos (FSK).

Las técnicas de cultivos celulares se realizaron en la Unidad de cultivos celulares del IIS La Fe. En la manipulación rutinaria de las células se utilizaron los reactivos y material fungible que se indica a continuación. El medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), el suero fetal bovino (FBS) y la solución de antibióticos penicilina/estreptomicina (10000 U/mL, 10000 µg/mL) se adquirieron en ThermoFisher. Las soluciones de tripsina 0.25 % (v/v) / EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético) 0.02 % (v/v) y L-Glutamina (100 mM) fueron suministradas por Cultek. La solución fostato salina (PBS, 0.01 M, pH 7.4) fue preparada disolviendo el

contenido de un sobre (Merck) en 1 L de agua desionizada ultrapura (Mili-Q) y esterilizada mediante autoclave (Witeg) a 121°C durante 20 min. Las placas de diferentes tamaños (6, 12, 24 y 96 pocillos) y los frascos de 75 cm² se compraron en Labclinics.

Las células se mantuvieron en incubadores de CO₂ modelo Heracell i150 a 37 °C en una atmósfera al 5 % (v/v) CO₂ y saturada de humedad en frascos de plástico de 75 cm². El medio de cultivo para ambos tipos celulares fue medio DMEM suplementado con 10 % (v/v) FBS, 4 mM L-glutamina y penicilina/estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL).

La confluencia de los cultivos se monitorizó periódicamente mediante microscopía de contraste de fases hasta alcanzar una confluencia del 80 %, siendo entonces necesario realizar un subcultivo (2 veces por semana). El rendimiento celular aproximado para un frasco en máxima confluencia fue de 10⁷ células para la línea celular 3T3 y de 2 × 10⁶ células para las células FSK. El subcultivo celular se llevó a cabo por incubación de las células con la solución de tripsina / EDTA durante 5 min a 37 °C. La ratio de dilución aproximada fue de 1:10 y 1:4 para las células 3T3 y FSK, respectivamente.

La densidad celular de la suspensión resultante se calculó con la cámara mejorada de Neubauer y su viabilidad se estimó antes de la siembra, para cada experimento, mediante el ensayo de exclusión con el colorante azul de tripán en PBS (0.04 g/L, Merck), que es permeable en aquellas células con la membrana celular dañada. Sólo se consideraron aptos para la realización de experimentos los cultivos cuya viabilidad fue superior al 90 %. Además, los cultivos fueron analizados de forma periódica para descartar la presencia de micoplasma mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

3.4. Ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 de captación de rojo neutro (NRU).

El ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 de captación de rojo neutro (NRU) se puso a punto siguiendo la Guía número 432 de la OCDE para determinar si un fármaco o metabolito tiene propiedades fototóxicas (90, 131). El protocolo de este ensayo se esquematiza en la Figura 3.4.

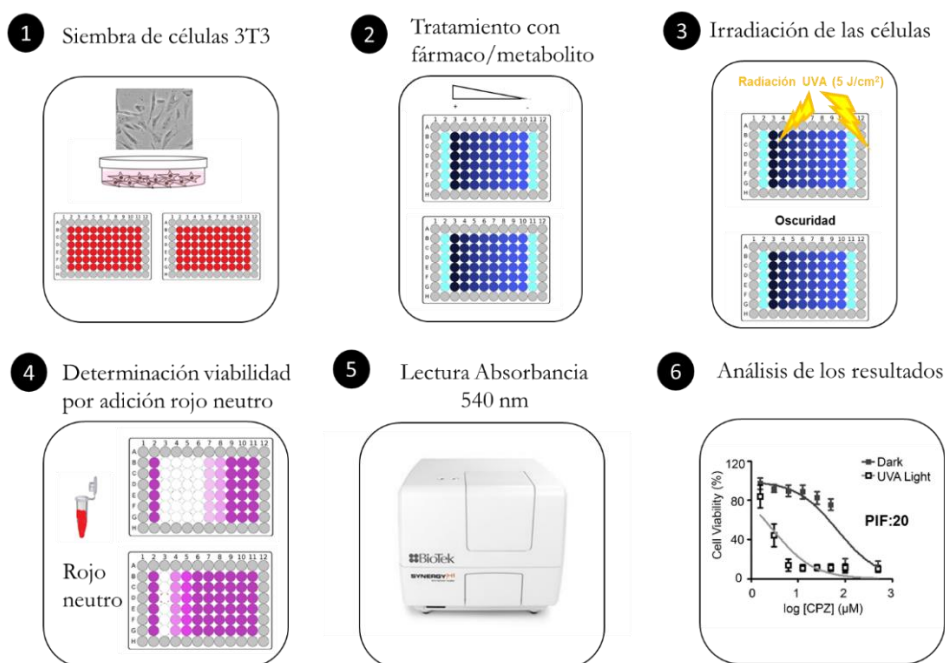


Figura 3.4. Procedimiento del ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 NRU.

Así, para cada fármaco o metabolito a estudio, se sembraron 2 placas de 96 pocillos con células 3T3 a una densidad de 2.5×10^4 células/pocillo. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó por soluciones preparadas a las concentraciones seleccionadas en base a la bibliografía existente y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Como control positivo y negativo del ensayo,

se emplearon la CPZ y el surfactante dodecil sulfato sódico (SDS, Merck), respectivamente.

Posteriormente, una de las placas se irradió en el fotorreactor con una dosis de luz UVA de 5 J/cm² y la otra se mantuvo en condiciones de oscuridad. A continuación, el medio de los pocillos fue aspirado y se adicionó a cada pocillo 100 µL de medio de cultivo fresco. Los cultivos celulares se mantuvieron en el incubador durante 24 h adicionales. Una vez transcurrido este tiempo, se determinó la viabilidad para cada una de las condiciones experimentales a través del colorante vital rojo neutro. Este ensayo está basado en la habilidad de las células viables en incorporar en los lisosomas este colorante (142). Para ello, se adicionó a cada pocillo 20 µL de solución de rojo neutro en PBS (50 µg/mL, Merck) y se realizó una incubación durante 3 h a 37 °C para la captación del colorante por parte de las células viables. A continuación, los pocillos de las placas se lavaron con PBS para eliminar el exceso de rojo neutro no internalizado por las células. El colorante incorporado fue extraído de los lisosomas tras la adición de 100 µL de solución de extracción a cada pocillo (agua destilada 50 % (v/v), etanol absoluto 49.5 % (v/v) y ácido acético 0.5 % (v/v)). Por último, la absorbancia de todas las placas se registró a una $\lambda = 540$ nm.

Para cada condición, se calculó el porcentaje de viabilidad del cultivo celular teniendo en cuenta la absorbancia del control de células sin tratamiento alguno a partir de la ecuación $\% \text{viabilidad} = 100 \times \frac{\text{Abs células tratadas}}{\text{Abs células sin tratar}}$.

Para cada uno de los compuestos y condición, se establecieron curvas de dosis-respuesta mediante el software estadístico GraphPad 5.0, las cuales permitieron determinar el valor de la concentración de compuesto que

produce un 50 % de reducción en la captación de rojo neutro (IC50) tanto en condiciones de oscuridad como de irradiación UVA. Finalmente, el valor numérico del factor fotoirritante (PIF) para cada compuesto se calculó con la ecuación $PIF = \frac{IC50\text{ oscuridad}}{IC50\text{ luz UVA}}$. De acuerdo a la Guía de la OCDE (90), un compuesto es clasificado como “fototóxico” si el valor del PIF es superior a 5, “probablemente fototóxico” cuando el valor del PIF está comprendido entre 2 y 5, y “no fototóxico” cuando el PIF es inferior 2. Los resultados se consideraron válidos cuando el PIF del control positivo CPZ fue superior a 15, y el PIF del SDS, control negativo del ensayo, fue de 1.

3.5. Ensayo de fotooxidación de proteínas.

El ensayo de fotooxidación de proteínas se realizó utilizando como modelo la HSA mediante el método de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (134). Este ensayo está basado en la reacción entre los grupos carbonilos de la proteína oxidada y el DNPH para la formación de los aductos proteína-dinitrofenilhidrazona, los cuáles son fácilmente detectados mediante espectroscopia UV/Vis a $\lambda = 375\text{ nm}$ (Figura 3.5).

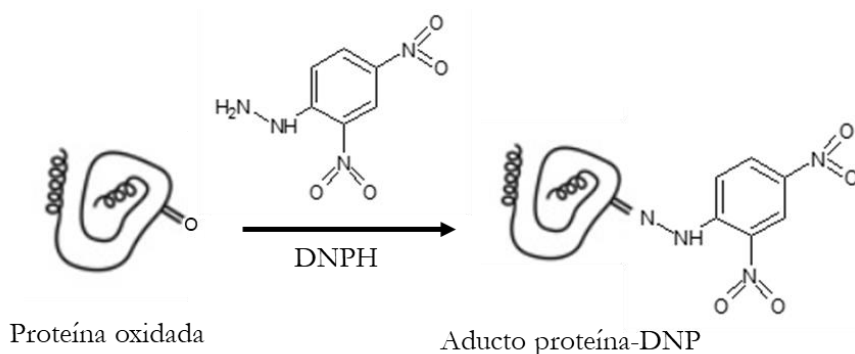


Figura 3.5. Ensayo de fotooxidación de proteínas por el método DNPH.

Para ello, se prepararon soluciones de HSA (Merck) en PBS (5 mg/mL) conteniendo el fármaco o metabolito a la concentración indicada en el experimento. Como control negativo, se utilizó la solución de HSA sin compuesto. A continuación, 200 μ L de cada solución se irradiaron en el fotorreactor (10 J/cm²), mientras que otros 200 μ L fueron mantenidos en oscuridad. Seguidamente, a cada una de las soluciones se adicionó 200 μ L de DNPH (10 mM, Merck) y las mezclas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente para la formación de los aductos estables. Una vez finalizado el tiempo de reacción, las proteínas presentes en las muestras se precipitaron mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 20 % (v/v) y su incubación en hielo durante 15 min. Los precipitados proteicos se lavaron dos veces con una solución de etanol/acetato de etilo 1:1 (v/v) conteniendo TCA 20 % con la finalidad de eliminar todo el DNPH libre. Finalmente, las muestras se secaron a 60 °C para la eliminación completa de los solventes. Los aductos se resolubilizaron en 100 μ L de cloruro de guanidina 6M incubando a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se registró la absorbancia de todas las muestras a $\lambda = 375$ nm en el lector de placas Synergy H1 (Biotek). El grado de fotooxidación de la proteína HSA se expresó como nanomoles del grupo carbonilo / mg de proteína, teniendo en cuenta que el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ) para el grupo dinitrofenilhidrazona a 375 nm es de $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.6. Ensayo de fotosensibilización al ADN plasmídico.

El ensayo de fotosensibilización al ADN plasmídico se puso a punto utilizando el plásmido pBR322 (4361 bp, Roche). En particular, este ensayo permite de una forma directa comprobar los cortes de cadena simple (SSB)

sobre la doble hélice de ADN. También permite analizar de forma indirecta otras alteraciones en el ADN con el uso combinado de las enzimas de reparación específicas de bases (BER) y nucleótidos (NER) que generan SSB en la doble hélice de ADN cuando reconocen la modificación química por la que tienen afinidad. El ensayo está basado en la diferente movilidad electroforética en gel de agarosa de las moléculas de ADN que comparten secuencia de nucleótidos, pero que difieren en su conformación (Figura 3.6). De esta forma, una molécula de plásmido en su forma nativa (Forma I) muestra una conformación superenrollada y compacta, y migra en el gel de agarosa más rápido que una molécula de ADN linear como consecuencia de una rotura de la doble hélice (Forma III) y que una molécula de plásmido en conformación circular relajada (Forma II), indicando la existencia de SSB. La cuantificación del daño fotosensibilizado al ADN se llevó a cabo por densitometría de la intensidad perteneciente a cada forma del plásmido.

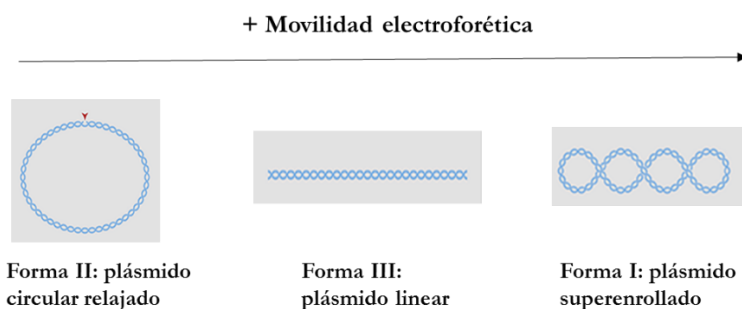


Figura 3.6. Conformaciones de un plásmido y su movilidad electroforética.

Para revelar los diferentes tipos de daño en el ADN, es decir, poder detectar las alteraciones químicas en las bases nitrogenadas, se emplearon la enzima endonucleasa V del fago T4 (Endo V), la endonucleasa III (Endo III) y la

ADN formamidopirimidina glicosilasa (FPG), ambas de *Escherichia coli*. La primera fue adquirida a Werfen y las otras dos a Merck.

Con este fin, se prepararon mezclas de plásmido (250 ng) y de compuesto a las concentraciones seleccionadas en PBS. A continuación, estas soluciones fueron mantenidas en oscuridad (control negativo) o irradiadas con una dosis UVA de 15 J/cm². Seguidamente, se añadió a todas las muestras tampón de carga (0.25 % (p/v) azul bromofenol (Merck), 30 % (v/v) glicerol en agua ultrapura), y se cargaron en un gel de agarosa (Pronadisa) al 1 % (p/v) conteniendo SYBRSafe[®] (ThermoFisher, dilución 1:50000). En los experimentos con enzimas de reparación, después de la irradiación, las muestras de plásmido fueron digeridas con un exceso de enzima Endo V, Endo III o FPG (0.5 U) durante 1 h a 37 °C y después, se adicionó el tampón de carga a las muestras para su carga en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE (0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA) a un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1 h. Por último, los geles se visualizaron utilizando el sistema de imagen para geles Gel Logic 200 (Kodak) y la cuantificación de las bandas correspondientes a la Forma I (plásmido superenrollado) y Forma II (plásmido relajado con cortes de cadena simple) se realizó mediante densitometría con el software Image-J. La proporción relativa de la Forma II se calculó con la ecuación:

$$\% \text{ Forma II} = 100 \times \frac{\text{Densitometría Forma II}}{\text{Densitometría Forma I} + \text{Densitometría Forma II}}$$

En todos los casos, se restó el porcentaje de la Forma II presente en el control negativo del ensayo (plásmido pBr322 en condiciones de oscuridad).

3.7 Ensayo de electroforesis en gel de célula individual en condiciones alcalinas (ensayo *comet*).

El ensayo *comet* en condiciones alcalinas se realizó para la detección de SSB, DSB y de sitios lábiles alcalinos producidos en el ADN cromosómico de las células por tratamiento combinado de los fármacos o sus metabolitos con la luz UVA. Éste está basado en la diferente movilidad electroforética que presenta el ADN cromosómico fragmentado frente al ADN intacto (52, 132). Así, el ADN de la célula intacta migra compacto y tras su marcaje con una sonda fluorescente se observa al microscopio con forma de nucleóide. Por el contrario, el ADN de una célula dañada migra más rápido a través de la agarosa hacia el cátodo, y adquiere la característica forma de cola (Figura 3.7). La descripción de este ensayo se ilustra en la Figura 3.8.

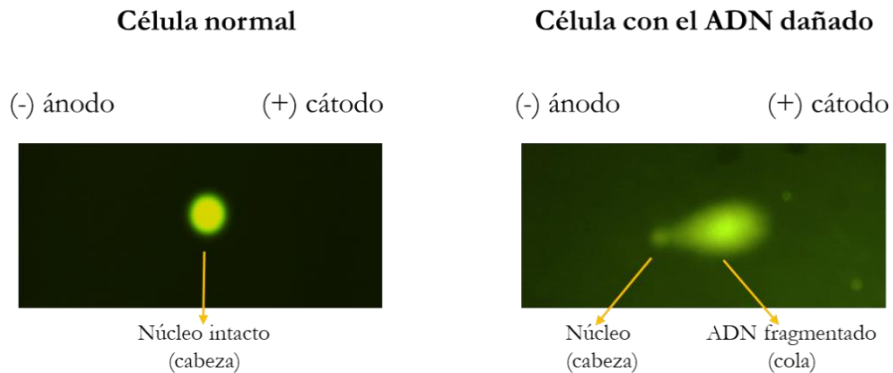


Figura 3.7. Fundamento del ensayo *comet* en condiciones alcalinas para la detección de daño al ADN. El ADN fragmentado migra con mayor velocidad que el ADN intacto cuando se somete a un campo eléctrico y adquiere forma de cola.

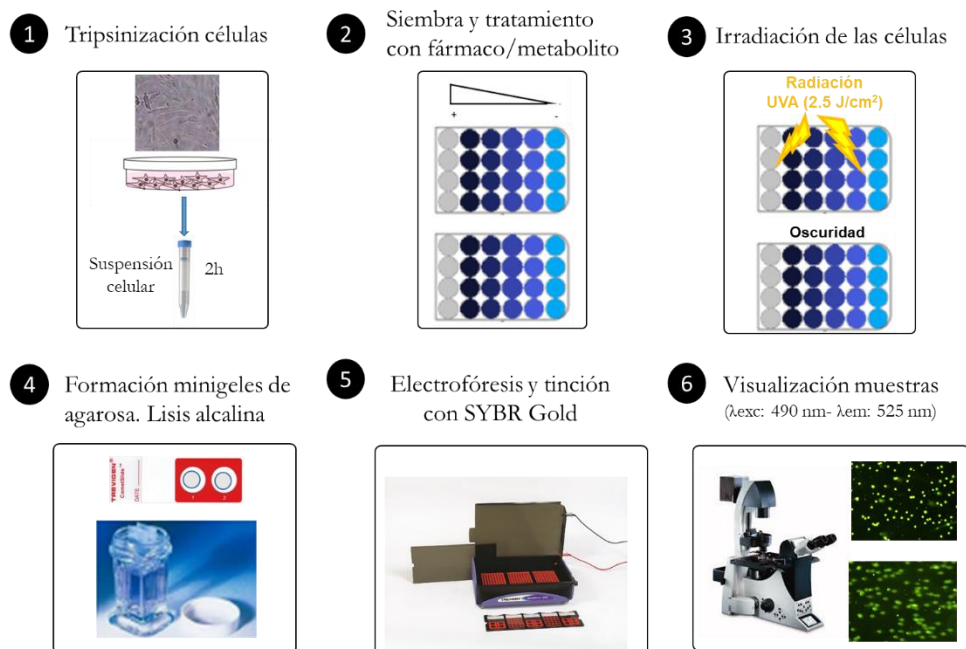


Figura 3.8. Procedimiento del ensayo *comet* en condiciones alcalinas.

Para llevar a cabo un experimento *comet* se partió de un cultivo celular de fibroblastos FSK en crecimiento exponencial. Las células se recolectaron mediante tripsinización y, a continuación, se resuspendieron en 5 mL de PBS frío. El proceso de tripsinización induce en las células FSK un ligero daño en el ADN. Por esta razón, las células tripsinizadas se mantuvieron en reposo durante 2 h en el PBS frío para permitir así la reparación completa del daño generado por la maquinaria de reparación presente en la célula. Trascurrido este tiempo, a partir de la suspensión celular, se sembraron 2 placas de 24 pocillos (densidad de 1×10^5 células/pocillo) y a continuación, las células se trataron con los fármacos y metabolitos a las concentraciones establecidas durante 1 h a 37 °C en condiciones de oscuridad.

Después del periodo de incubación, una de las placas fue irradiada en el fotorreactor con luz UVA (2.5 J/cm^2), mientras que la otra se mantuvo en oscuridad, actuando como control negativo del ensayo. Seguidamente, se extrajo una alícuota de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de cada suspensión celular y se determinó su viabilidad mediante exclusión con azul de tripán, considerándose aptas para el ensayo aquellas condiciones con una viabilidad superior al 85 %. Una vez finalizado el proceso de irradiación, las células fueron recogidas en tubos eppendorf. A continuación, $100 \text{ }\mu\text{L}$ de suspensión celular (2.0×10^4 células) se mezclaron con $100 \text{ }\mu\text{L}$ de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (1 % (p/v)). La mezcla resultante se depositó en un portaobjetos de alta adherencia (Trevigen), formando minigeles de agarosa, donde las células se encuentran embebidas en su interior. Los portaobjetos se incubaron durante 10 min en frío para facilitar la gelificación de los minigeles. Por último, se realizó la lisis celular mediante incubación de los portaobjetos en tampón de lisis (2.5 M NaCl, 0.1 M Na_2EDTA , 0.01 M Tris, 1 % (p/v) TritonX-100, pH 10) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante toda la noche.

Al día siguiente, los portaobjetos se colocaron en el interior de la cubeta de electroforesis previamente cargada con el tampón alcalino de electroforesis en frío (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) y fueron incubados durante 40 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ para facilitar el desenrollamiento del ADN cromosómico. La electroforesis se realizó en el tanque de Trevigen utilizando un voltaje constante de 21 V (1 V/cm) durante 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Una vez finalizada, los portaobjetos se lavaron dos veces durante 5 min con PBS. Después, éstos fueron incubados con dos soluciones de etanol 70 % (v/v) y etanol absoluto para la fijación del ADN cromosómico, y se secaron en estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta que la agarosa quedó completamente deshidratada. En último lugar se

realizó la tinción del ADN cromosómico por incubación con una solución de SYBRTM Gold (ThermoFisher, dilución 1:10.000, $\lambda_{exc} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 537 \text{ nm}$) en tampón TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Los portaobjetos se dejaron secar por completo y se almacenaron protegidos de la luz hasta su visualización en el microscopio de fluorescencia.

La visualización de los *comets* se llevó a cabo utilizando el microscopio de fluorescencia Leica DMI 4000B mediante el filtro de fluoresceína (FITC, $\lambda_{exc}=490 \text{ nm}$). Para cada muestra, se tomaron fotografías de cinco regiones diferentes del minigel conteniendo *comet*. Finalmente, el daño formado al ADN cromosómico se calculó analizando para cada una de las condiciones experimentales al menos 100 *comets* mediante 2 sistemas complementarios:

(I) Escala visual de clasificación del daño al ADN en 6 categorías discretas (Figura 3.9) con la siguiente ecuación: $[(N_{clase0} \text{ comets} \times 0) + (N_{clase1} \text{ comets} \times 1) + (N_{clase2} \text{ comets} \times 2) + (N_{clase3} \text{ comets} \times 3) + (N_{clase4} \text{ comets} \times 4) + (N_{clase5} \text{ comets} \times 5) + (N_{clase6} \text{ comets} \times 6)]/6$, donde los *comets* de clase 0 tienen el ADN intacto, y los *comets* de clase 6 presentan todo su ADN fragmentado.

(II) Uso del software Open Comet 1.3, incorporado al software de análisis Image-J, en el que se realiza densitometría de la fluorescencia presente en la cola de cada *comet*, calculando así el % de ADN existente en la cola.

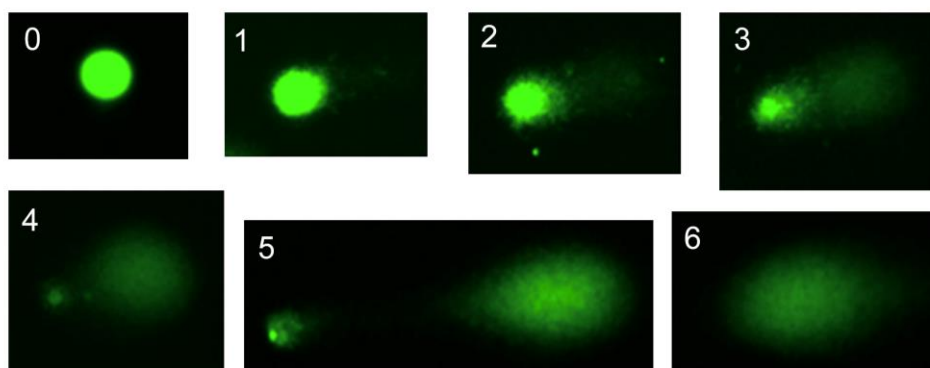


Figura 3.9. Escala visual para la clasificación de los *comets* según la cantidad de lesiones en el ADN. En la clase 0 (sin daño) se observa un núcleo compacto, mientras que en la clase 6 (máximo daño al ADN) se aprecia únicamente una apariencia de cola constituida por el ADN fragmentado.

3.8. Ensayo de reparación del daño al ADN cromosómico.

La reparación del daño fotoinducido al ADN por los fármacos y metabolitos se realizó de forma análoga al ensayo *comet* con pequeñas modificaciones. Así, la siembra celular, el tratamiento con los compuestos y la irradiación se llevó a cabo según se ha explicado en la sección previa. Una vez que los minigeles de agarosa estuvieron gelificados, los portaobjetos fueron incubados en 10 mL de medio de cultivo fresco a 37 °C dentro del incubador de CO₂ a diferentes tiempos, que se corresponden con los tiempos de recuperación (3 h, 6 h y 18 h). Transcurrido el tiempo de recuperación, el portaobjetos se introdujo en el tampón de lisis celular para detener el proceso de reparación del ADN dañado. El experimento continuó hasta la visualización del daño al ADN no reparado mediante microscopía de fluorescencia, como se ha descrito previamente.

3.9. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Elisa) para la cuantificación del marcador 8-oxo-dG.

Este ensayo se llevó a cabo para cuantificar la formación del marcador de daño oxidativo 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) en el ADN de las células como consecuencia del proceso de fotosensibilización, utilizando el Kit II 8-oxo-dG obtenido de Trevigen. Éste está basado en la técnica Elisa de tipo competitivo, cuya descripción se ilustra en la Figura 3.10.

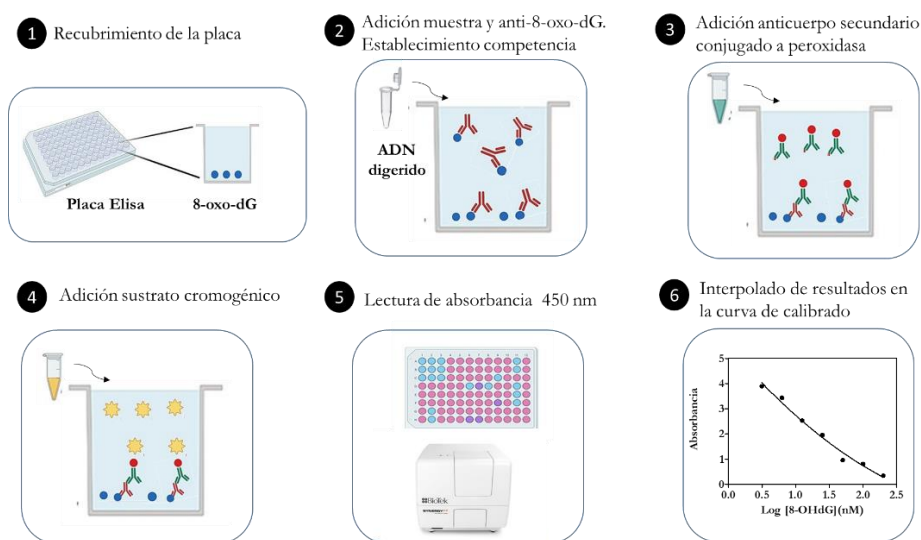


Figura 3.10. Procedimiento del ensayo Elisa de tipo competitivo.

En este ensayo, los pocillos de la placa de 96 pocillos vienen recubiertos por el fabricante con el analito cuya concentración se desea determinar, en este caso, 8-oxo-dG. A cada pocillo se le añade un volumen similar de muestra y un anticuerpo monoclonal anti-8-oxo-dG. De esta forma, se establece una competición del anticuerpo monoclonal anti 8-OH-dG entre el 8-oxo-dG inmovilizado sobre el pocillo de la placa y el presente en la muestra. A mayor

concentración de 8-oxo-dG, la cantidad de anticuerpo capturado en la placa será menor. El anticuerpo primario es reconocido tras una incubación con el anticuerpo secundario de ratón conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, se adiciona el sustrato colorimétrico de dicha enzima TACS-Sapphire y se incuba durante 15 min para desarrollar un color azul. La reacción se detiene por adición de HCl, generando un derivado de color amarillo, cuya absorbancia se registra a 450 nm. La determinación del contenido en 8-oxo-dG de cada muestra se realiza por interpolado de la absorbancia en una curva de calibrado elaborada mediante el estándar proporcionado por el fabricante del kit.

Se sembraron los fibroblastos FSK en 2 placas de 12 pocillos (7.5×10^5 células/pocillo) y se mantuvieron en el incubador de CO₂ durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se trataron con los fármacos y sus metabolitos y se incubaron durante 30 min en oscuridad. A continuación, una de las placas se irradió con luz UVA (2.5 J/cm²) mientras que la otra placa se conservó en condiciones de oscuridad. Seguidamente, las células se recolectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL y se purificó su ADN genómico.

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit (Neo-Biotech), basado en la lisis celular por acción de la proteinasa K y posterior purificación por afinidad utilizando membranas de sílice. El ADN purificado fue eluido en 50 µL de agua de grado de biología molecular, libre de ADNasas/ARNasas. El ADN extraído de las muestras se cuantificó con el equipo Nanodrop 2000c (ThermoScientific) mediante espectroscopia UV. Además, se verificó la integridad del ADN de las muestras mediante el cociente A260/A280, estando comprendido entre 1.8 y 2.0. Después, 2 µg de ADN genómico por cada muestra fueron digeridos

con ADNasa I (1 U/muestra) a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación con la enzima fosfatasa alcalina (1 U/muestra) durante 1 h.

La determinación del marcador 8-oxo-dG en el ADN de las muestras se realizó mediante la técnica de Elisa de tipo competitivo. Brevemente, sobre la placa de 96 pocillos tapizada con 8-oxo-dG se añadieron las muestras (2 µg de ADN), el patrón de 8-oxo-dG (rango 3.13 nM - 200 nM), y 25 µL de anticuerpo monoclonal anti 8-OH-dG (dilución 1:250). La placa se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después, el contenido de los pocillos se aspiró y se realizaron 4 lavados con 300 µL de PBS-Tween 20 0.1 % (v/v). Seguidamente, se añadió a cada pocillo 50 µL de anticuerpo secundario Anti-Ratón IgG-HRP (dilución 1:500) y la placa se incubó 1 h a temperatura ambiente. Después de 4 lavados con 300 µL de tampón PBS-Tween 20 0.1 % (v/v), se añadió a todos los pocillos 50 µL del sustrato colorímetro TACS-Sapphire™ y la placa se incubó durante 15 min en oscuridad. Las reacciones se detuvieron por adición de 50 µL de HCl 0.2 M. Por último, la absorbancia de toda la placa fue registrada a una $\lambda = 450$ nm. El marcador 8-oxo-dG se cuantificó en las muestras de las diferentes condiciones experimentales a partir del interpolado del valor de absorbancia obtenido en la curva de calibración realizada con los patrones de 8-oxo-dG.

3.10. Análisis y tratamiento estadístico de los resultados.

Con carácter general, los resultados presentados en esta tesis doctoral se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de un mínimo de tres experimentos independientes entre sí. Además, cada experimento incluyó al menos un mínimo de dos replicados técnicos de cada una de las

condiciones ensayadas. Para determinar la posible existencia de diferencias significativas en los valores de una variable cuantitativa entre dos grupos experimentales, por ejemplo, condiciones de oscuridad y luz UVA, se utilizó el Test T-Student asumiendo normalidad y homocedasticidad (igualdad de varianzas) en ambas poblaciones. En los análisis estadísticos, todas aquellas diferencias con un valor $p < 0.05$ fueron consideradas significativas: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Capítulo 4. Alteraciones en la foto(geno)toxicidad del fármaco diclofenaco asociadas a la hidroxilación del grupo cromóforo durante su biotransformación.

4.1. Introducción.

El diclofenaco (o ácido 2-(2,6-diclorofenilamino) fenilacético, DCF) es un fármaco que pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos inicialmente descrito como inhibidor de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) (143), que cataliza la oxidación del ácido araquidónico clave en la síntesis de las prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos (Figura 4.1).

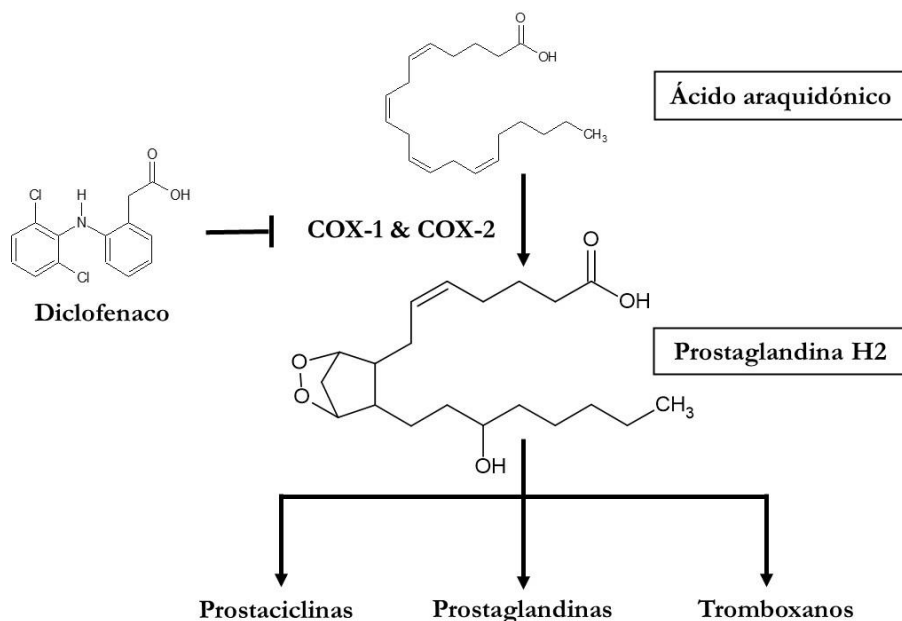


Figura 4.1. Mecanismo de acción del fármaco diclofenaco.

En este contexto, el DCF se utiliza habitualmente como analgésico y también en el tratamiento de enfermedades reumáticas y se administra tanto por la vía oral como por la vía tópica. Entre las principales reacciones adversas se incluyen afecciones hepáticas, renales, gastrointestinales y cardiovasculares. Éstas son potencialmente graves y se asocian a su administración por la vía oral. Por tanto, la administración tópica constituye

una alternativa más atractiva para el tratamiento del dolor localizado y evitar así los efectos secundarios descritos (144, 145). Sin embargo, estudios previos muestran que el fármaco DCF en combinación con la luz solar es capaz de inducir reacciones de fotosensibilidad (146-149).

Con respecto a su metabolismo, éste se transforma por acción de la enzima glucuronil-transferasa UGT2B7 en DCF-acil-glucurónido, y por acción de los citocromos P450, se puede oxidar para formar metabolitos hidroxilados (150, 151). Las rutas metabólicas más importantes son las hidroxilaciones en las posiciones 4' o 5, generando así los metabolitos 4'OH-DCF y 5OH-DCF, cuyas estructuras químicas se representan en la Figura 4.2A. La biotransformación de un fármaco se asocia normalmente con un aumento de su hidrofiliidad para facilitar su excreción y una disminución de la toxicidad. Sin embargo, en ocasiones los metabolitos formados resultan más reactivos y tóxicos que el fármaco original, pudiendo incrementar su actividad fotobiológica (141).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este capítulo se estudiarán las propiedades fotosensibilizantes (fototoxicidad y fotogenotoxicidad) del fármaco DCF y la contribución de dos de sus metabolitos principales 4'OH-DCF y 5OH-DCF, los cuales no se han tenido nunca en cuenta en el estudio de las reacciones de fotosensibilidad provocadas por dicho fármaco.

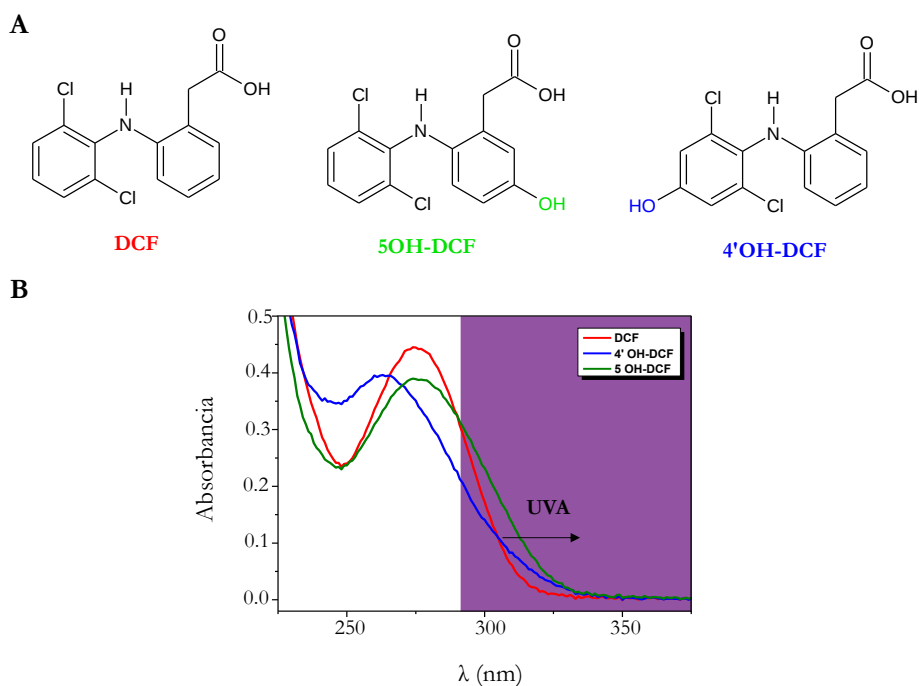


Figura 4.2. (A) Estructuras químicas del **diclofenaco (DCF)** y sus metabolitos **4'OH-DCF** y **5OH-DCF**. (B) Espectros de absorción UV del **DCF**, **4'OH-DCF** y **5OH-DCF** en PBS 0.01 M (40 μ M).

4.2. Resultados y discusión.

En primer lugar, para determinar si el metabolismo de Fase I del DCF, y en particular las hidroxilaciones en las posiciones 4' y 5, provocan la alteración de su grupo cromóforo, se registraron los espectros de absorción del DCF y de sus metabolitos 4'OH-DCF y 5OH-DCF en tampón fosfato salino (PBS) (Figura 4.2B). Así, el DCF reveló un máximo de absorción a 275 nm, solapando un pequeño porcentaje de éste con el espectro solar. Con respecto a sus dos metabolitos, las hidroxilaciones en ambas posiciones del

grupo cromóforo modificaron sus propiedades de absorción. Los espectros UV mostraron un efecto batocrómico con un desplazamiento hacia longitudes de onda superiores dentro de la región UVA, aumentando de esta forma la fracción activa dentro del espectro de luz solar desencadenante de las reacciones de fotosensibilidad.

4.2.1. Estudio de la fototoxicidad.

La evaluación de la fototoxicidad del DCF y sus metabolitos se llevó a cabo mediante el ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 de captación de rojo neutro (NRU), descrito en la Guía N°432 de la OCDE para la evaluación toxicológica de compuestos químicos (90). Este ensayo está basado en comparar el efecto de un compuesto sobre la viabilidad celular de fibroblastos de ratón 3T3 en presencia o ausencia de irradiación. Para ello, se utiliza una dosis de luz UVA no citotóxica equivalente a 5 J/cm². Como indicador de viabilidad celular se utiliza el colorante vital rojo neutro. Para cada compuesto se obtienen curvas dosis-respuesta en oscuridad y en presencia de irradiación y se estima el valor de la concentración de compuesto que reduce la captación del rojo neutro en un 50 % (IC₅₀). Finalmente, se calcula el valor del factor fotoirritante (PIF), que se define como el cociente entre la IC₅₀ de un compuesto, en oscuridad y en condiciones de irradiación. Un valor del PIF ≥ 5 indica que un compuesto presenta fototoxicidad, mientras que un PIF < 2 predice que el compuesto no es fototóxico. Valores intermedios del PIF señalan probable fototoxicidad. En el ensayo NRU se emplean como controles positivo y negativo la clorpromazina (CPZ), cuyo PIF ≥ 15 y el dodecilsulfato sódico (SDS), con un valor del PIF cercano a la unidad.

Los fibroblastos 3T3 se incubaron con concentraciones crecientes de DCF o de los metabolitos hidroxilados en el rango de 0.05 mM a 4 mM, seleccionadas en base a bibliografía previa (152) y se irradiaron con luz UVA a la dosis previamente indicada o permanecieron en oscuridad. Para cada tratamiento se determinó el porcentaje de viabilidad celular, y se elaboraron curvas dosis-respuesta para estimar mediante regresión semilogarítmica los valores de IC50 en luz y oscuridad (Tabla 4.1 y Figura 4.3). A partir de estas IC50, se calculó el PIF tanto para el DCF como para sus metabolitos. Así, el metabolito 5OH-DCF presentó fototoxicidad con un PIF de 12. Por su parte, el DCF y su otro metabolito hidroxilado 4'OH-DCF, con un PIF de 3 y 2, respectivamente, se consideraron como probable fototóxicos.

Tabla 4.1. Fototoxicidad del DCF y sus metabolitos en el ensayo 3T3 NRU.

Compuesto	IC50 Oscuridad (μM)	IC50 Luz UVA (μM)	Factor Fotoirritante (PIF) ¹
CPZ	84 ± 18	4 ± 1	21
DCF	688 ± 63	254 ± 58	3
4'OH-DCF	766 ± 85	375 ± 55	2
5OH-DCF	813 ± 106	68 ± 27	12
SDS	202 ± 25	244 ± 48	1

¹De acuerdo a la Guía N°432 de la OCDE (2019), PIF < 2 significa “No fototoxicidad”; 2 < PIF < 5 significa “Probable fototoxicidad” y un PIF > 5 “Fototoxicidad”.

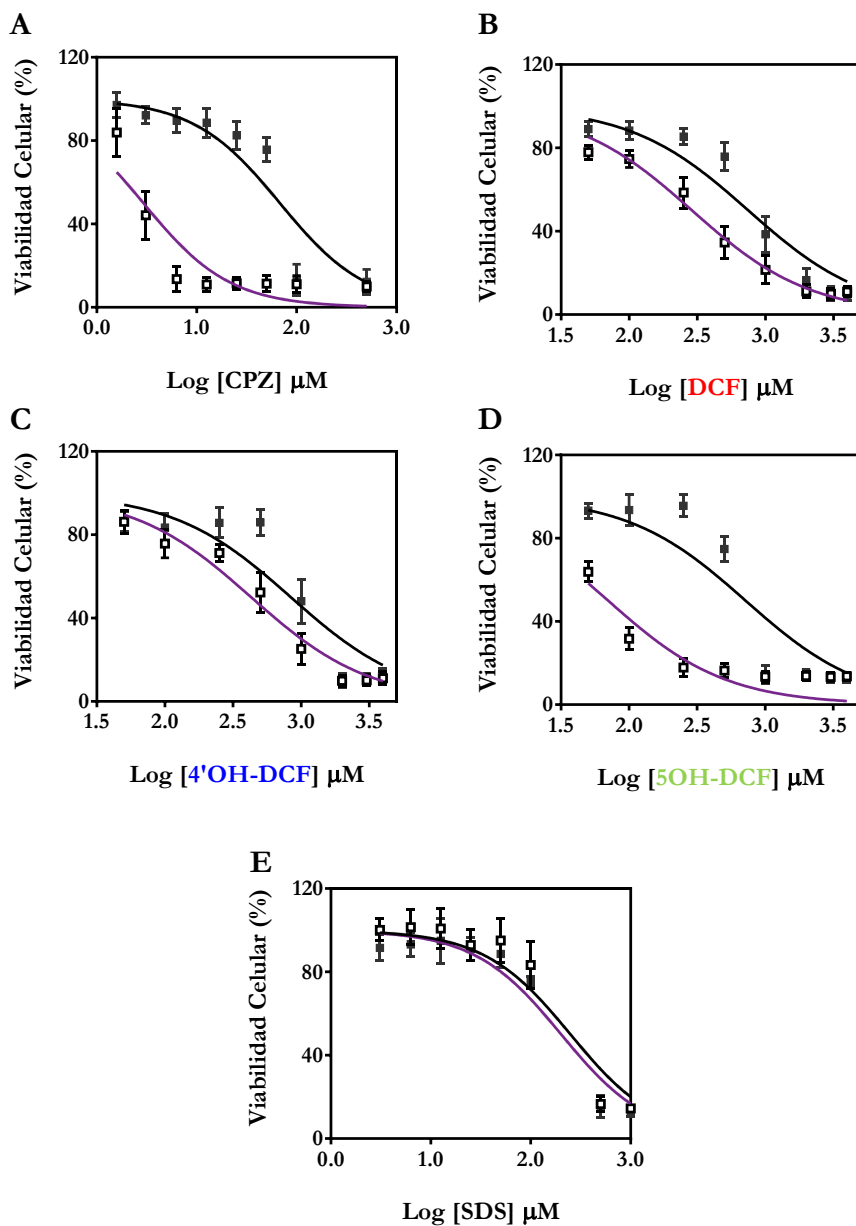


Figura 4.3. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular de las células 3T3 tratadas con CPZ (A), **DCF** (B) y sus metabolitos **4'OH-DCF** (C) y **5OH-DCF** (D) y SDS (E) en presencia de luz UVA a una dosis de 5 J/cm² (**violeta**) o en condiciones de oscuridad (**negro**).

4.2.2. Estudio del mecanismo de fototoxicidad.

Las propiedades fotosensibilizantes del DCF se asocian a la formación de su principal fotoproducto (148), que contiene un grupo clorocarbazol en su estructura química (Figura 4.4). Éste se forma por una fotodeshalogenación del DCF tras la rotura del enlace carbono-cloro y la formación del radical arilo, que presenta una alta reactividad (153, 154).

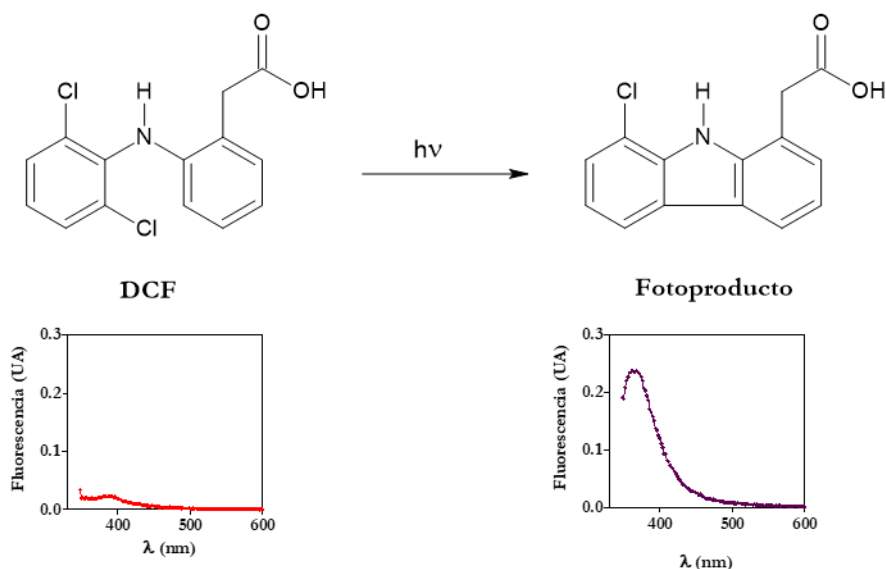


Figura 4.4. Formación del fotoproducto clorocarbazol del DCF.

Para comprobar si esta reacción tiene lugar también en sus metabolitos 4'OH-DCF y 5OH-DCF, se estudió la formación de este fotoproducto irradiando con luz UVA (5 J/cm^2) los metabolitos ($100 \mu\text{M}$). Éstos fueron preparados en diversas condiciones (a) PBS, (b) ácido linoleico 1 mM , (c) albúmina sérica humana (HSA) $100 \mu\text{M}$ y (d) en presencia de células FSK. Posteriormente, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia en placa negra de 96 pocillos y medir así los cambios en la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la formación del fotoproducto.

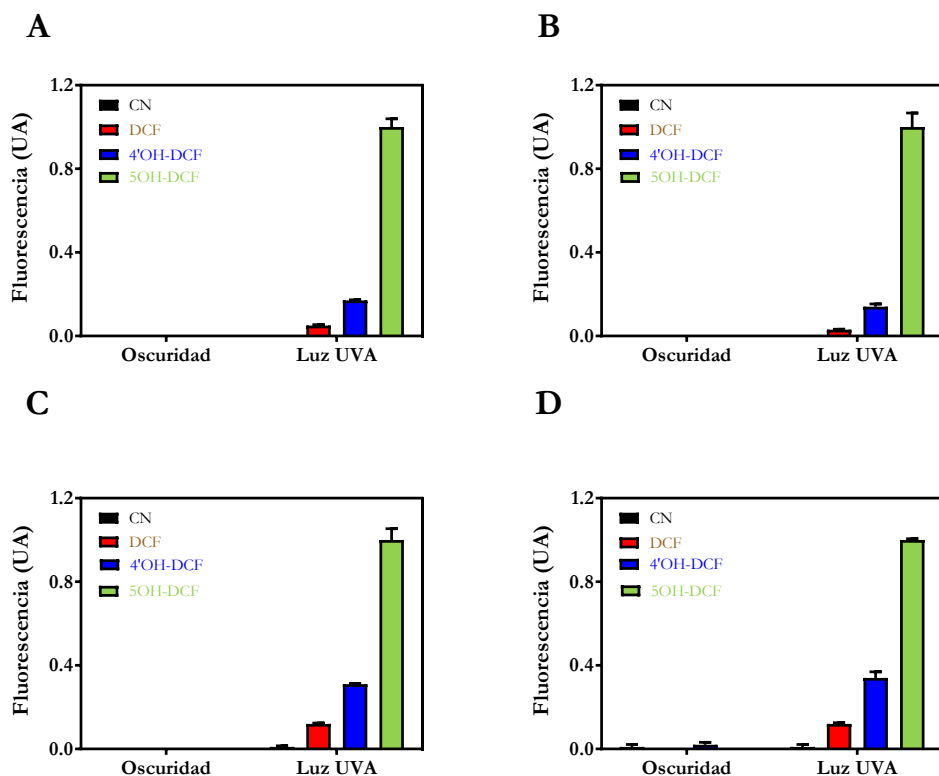


Figura 4.5. Emisión de fluorescencia de los fotoproductos formados después de irradiar el DCF y sus metabolitos (4'OH-DCF y 5OH-DCF) con UVA (5 J/cm²) en PBS (A), en presencia de ácido linoleico (B), HSA (C) y células FSK (D) ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 380$ nm). La fluorescencia del blanco en condiciones de oscuridad (CN) fue sustraída para todas las condiciones experimentales.

En la Figura 4.5 se observa que el aumento más elevado de la fluorescencia relativa la registró el metabolito 5OH-DCF en todas las condiciones analizadas, indicando una mayor formación de dicho fotoproducto. Los resultados sugirieron que el metabolito 5OH-DCF presentó una mayor fotorreactividad. Así, el incremento de la fototoxicidad inducido por el

5OH-DCF en comparación con el DCF y su otro metabolito hidroxilado 4'OH-DCF podría estar asociado no sólo con una absorción más eficiente de la radiación UVA, sino también con una mayor producción del fotoproducto clorocarbazol activo.

4.2.4. Estudio de la fotogenotoxicidad.

Como se ha indicado en la introducción general, las reacciones adversas de fototoxicidad implican a nivel molecular el daño oxidativo en las principales biomoléculas de la célula como son lípidos, proteínas y ADN. El estudio del daño fotosensibilizado al ADN inducido por un fármaco es de especial interés porque conduce a la aparición de mutaciones en las células afectadas si el daño no es reparado. La acumulación de mutaciones en el genoma favorece la conversión de una célula a un fenotipo cancerígeno (155).

Para el estudio de la fotogenotoxicidad del DCF y sus metabolitos, en primer lugar, se desarrollaron experimentos de fotoescisión utilizando el plásmido pBR322. El ensayo se basa en la conversión del plásmido de la Forma I (superenrollada) a la Forma II (relajada) tras su incubación con el fármaco o metabolito (que actúa como FS) y posterior irradiación con la luz UVA. Dicho grado de conversión se analiza mediante electroforesis en gel de agarosa teniendo en cuenta que ambas conformaciones, superenrollada y relajada, difieren en la movilidad electroforética, migrando así con mayor velocidad la forma superenrollada del plásmido. El ensayo permite detectar los cortes de cadena simple (SSB) en la doble hélice del ADN de una forma directa. Además, también permite detectar modificaciones químicas sobre el ADN a través del uso de enzimas de reparación por escisión de bases (BER), que generan SSB en el ADN cuando reconocen la modificación

química por la que tienen afinidad. Por tanto, se llevaron a cabo irradiaciones del plásmido pBR322 (250 ng) sólo o tratado con DCF, 4'OH-DCF y 5OH-DCF (100 μ M). Como control positivo se seleccionó el (*S*)-ketoprofeno (KP) (122). Las formas I y II del plásmido se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron mediante tinción con SYBRSafe® (Figura 4.6A). Después, las bandas correspondientes a ambas formas plasmídicas se cuantificaron por densitometría para calcular los porcentajes de la Forma II de cada condición (Figura 4.6B).

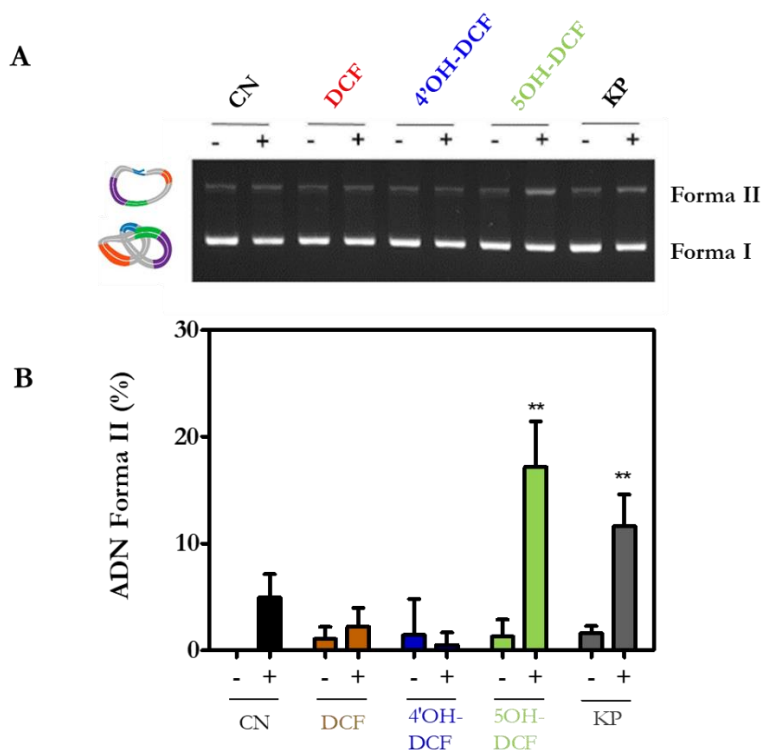


Figura 4.6. (A) Gel de agarosa (1 %) del plásmido pBR322 (250 ng) en presencia de DCF y sus metabolitos (100 μ M), en oscuridad (-) o irradiado con luz UVA (+). El (*S*)-ketoprofeno (KP, 10 μ M) fue el control positivo del ensayo. (B) Cuantificación por densitometría de la Forma II plasmídica en condiciones de oscuridad (-) o irradiados con luz UVA (+). Test T-Student: ** $p < 0.01$.

Los resultados indicaron que el control negativo del ensayo (CN), es decir, el plásmido pBR322 sin tratamiento, presentó un bajo porcentaje de su Forma II, y no se vio modificada después de la irradiación, indicando que la dosis de irradiación UVA no provocó un daño directo sobre la cadena de ADN. Dicho gel evidenció una generación significativa de SSB sólo para el metabolito 5OH-DCF, permaneciendo invariable la cantidad de SSB para el DCF y el 4'OH-DCF. Por tanto, el metabolito 5OH-DCF mostró un mayor potencial fotogenotóxico que el fármaco original.

Con el fin de estudiar las modificaciones químicas producidas sobre el ADN, se utilizaron diferentes enzimas BER: la Endo V para la detección de dímeros de timina y la Endo III y FPG, que reconocen los productos de degradación de las bases pirimidínicas (citosina y timina) y las bases púricas oxidadas (adenina y guanina), respectivamente.

La Figura 4.7 muestra que el metabolito 5OH-DCF en combinación con la luz UVA y la posterior incubación con cada una de las enzimas de restricción anteriormente mencionadas generó una mayor formación de SSB en el plásmido pBR322. Estos datos demostraron que el metabolito 5OH-DCF, además de inducir SSB directas en el ADN, alteró sus bases nitrogenadas, formando dímeros de timina y produciendo la degradación y oxidación de las bases púricas y pirimidínicas. Por el contrario, tanto el DCF como el 4'OH-DCF no tuvieron efecto alguno en la formación de SSB, y, por tanto, no generaron modificaciones químicas. Con estos experimentos se demostró de nuevo que el 5OH-DCF resultó más fotogenotóxico que el fármaco original, sin discriminar en el tipo de daño que provocó sobre la doble hélice del ADN.

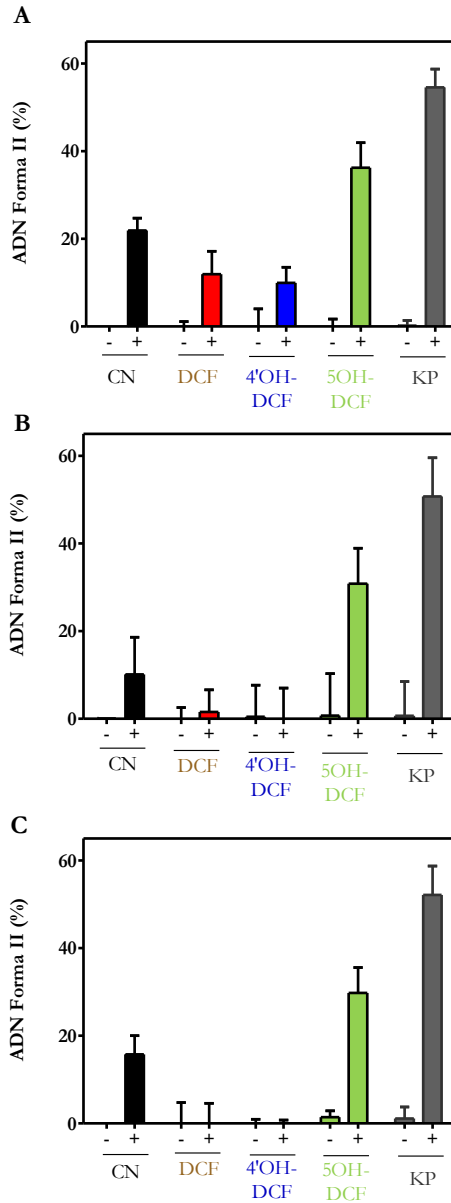


Figura 4.7. Porcentaje de formación de la Forma II del plásmido pBR322 tratado con DCF y sus metabolitos (100 μ M) irradiados con luz UVA (+, 15 J/cm²) o mantenidos en oscuridad (-) y posterior digestión con las enzimas de reparación Endo V (A), Endo III (B) y FPG (C).

Por otra parte, teniendo en cuenta que en un entorno celular la presencia de otras biomoléculas y metabolitos endógenos puede influir en el potencial fotogenotóxico de un compuesto, se estudió el daño fotoinducido al ADN por el DCF y sus metabolitos en un ambiente celular, relevante a nivel fisiológico, a través del ensayo *comet* o de electroforesis en gel de célula individual. Este ensayo en condiciones alcalinas permite detectar el daño del ADN cromosómico presente en una célula (156-159). La técnica se basa en la electroforesis del ADN nuclear (nucleoide) de células individuales lisadas y embebidas en gotas de agarosa. Su tinción mediante marcaje fluorescente aparenta ser una figura de un cometa o *comet*. La cabeza del *comet* está formada por ADN intacto, mientras que en la cola se localiza el ADN dañado y fragmentado, resultado de la combinación de SSB, DSB y sitios lábiles alcalinos. El porcentaje de ADN presente en la cola del *comet* es proporcional al daño al ADN de esa célula. Este cálculo se puede realizar mediante una clasificación basada en categorías discretas de daño al ADN (157) o a través de programas de software específicos (*Open Comet* 1.3 (160)), que realizan la densitometría de la cola de cada *comet*.

Para llevar a cabo estos ensayos, las células FSK se incubaron con el DCF y sus metabolitos (100 μ M) y las muestras se irradiaron con luz UVA (2.5 J/cm²). Posteriormente, las células se embebieron formando minigeles de agarosa sobre un portaobjetos y se lisaron. Luego, se realizó la electroforesis y el ADN de las células fue visualizado mediante su tinción con el marcador fluorescente SYBR Gold® en el microscopio óptico de fluorescencia (Filtro FITC λ_{exc} =490 nm). Para cada una de las condiciones, se calculó el porcentaje de daño en el ADN analizando al menos 100 células mediante el programa *Open Comet* 1.3 (Figura 4.8).

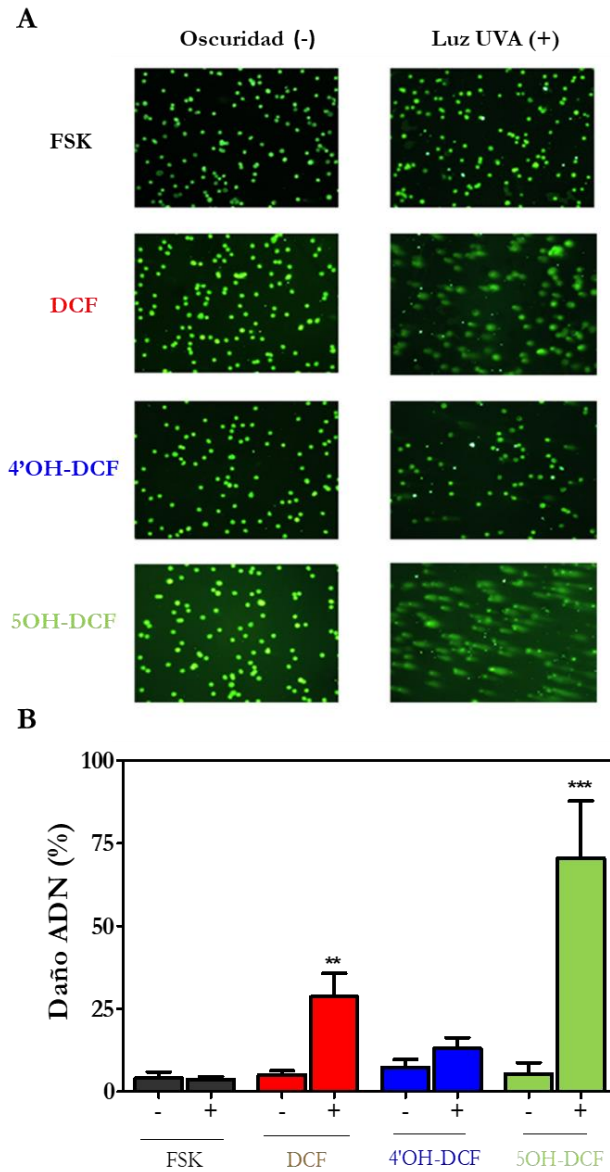


Figura 4.8. (A) Imágenes representativas del ensayo *comet* en condiciones alcalinas del DCF y sus metabolitos (100 μ M). FSK: Células no tratadas, Oscuridad (-): Células no irradiadas, Luz UVA (+): Células irradiadas (2.5 J/cm²) (B) Porcentaje de daño al ADN calculado con el software *Open Comet* 1.3. Test T-Student: **p < 0.01; ***p < 0.001.

En primer lugar, cabe destacar que la dosis seleccionada de radiación UVA (2.5 J/cm^2) no produjo genotoxicidad directa sobre las células FSK, con un núcleo compacto y un porcentaje de daño en el ADN inferior al 5 %, lo que resultó apropiado para la detección del daño fotoinducido. Con respecto al tratamiento del DCF, el fármaco generó *comets* con presencia de pequeñas colas indicativas de daño al ADN. Su cuantificación reveló un 25 % de daño al ADN. Con respecto a los metabolitos, el 4'OH-DCF no mostró apenas efecto alguno con un daño inferior al 10 % en concordancia con los experimentos realizados previamente con el plásmido pBR322. Una vez más, el metabolito 5OH-DCF presentó mayor fotogenotoxicidad que el DCF, con la generación de *comets* de gran intensidad de fluorescencia en la cola y un porcentaje de daño al ADN calculado cercano al 70 %.

A la hora de analizar las imágenes de microscopía de fluorescencia mediante el software *Open Comet* 1.3, se encontraron dificultades porque este programa no detectó correctamente aquellos *comets* con forma irregular, *comets* muy dañados o los *comets* cuya fluorescencia solapaba. Por esta razón, en los sucesivos capítulos de esta tesis los análisis de los experimentos de fotogenotoxicidad se llevaron a cabo mediante la clasificación basada en categorías discretas de daño al ADN.

Como se ha visto en la introducción, la generación de daño al ADN por la acción de un FS desencadena la activación de las diferentes rutas celulares para la reparación de dicho daño y, mantener así su estabilidad genética. Si el daño al ADN generado supera un determinado umbral o si la célula no es capaz de reparar el daño generado, las células suelen activar el mecanismo de muerte celular programada. Sin embargo, en algunas ocasiones durante los procesos de reparación de dicho daño, o si la reparación del daño

generado es incompleta, se pueden producir mutaciones en el genoma de la célula, llevando en última instancia a la aparición de procesos tumorigénicos (161).

Así, en experimentos adicionales, se investigó la capacidad de las células FSK para reparar el daño al ADN generado por el tratamiento combinado del DCF o su metabolito hidroxilado 5OH-DCF y la radiación UVA. Para ello, las células FSK se trataron con el DCF o su metabolito en combinación con la luz UVA (2.5 J/cm^2) y después, se incubaron en medio de cultivo fresco durante diferentes periodos de tiempo: 3 h, 6 h y 18 h para permitir la activación de las enzimas BER o NER entre otras y reparar así, el ADN dañado en las células. Después, las muestras fueron procesadas y mediante el ensayo *comet* se calculó el porcentaje de daño al ADN que no fue reparado por las células (Figura 4.9).

Como tendencia general, el daño al ADN generado por el DCF y el 5OH-DCF disminuyó en las células FSK a medida que aumentó el tiempo de recuperación. Sin embargo, mientras que para el fármaco original la mayoría del daño fue reparado por las células en las tres primeras horas de recuperación tras la irradiación, pasando de un 25 % de daño al ADN a un porcentaje inferior al 10 %, para el metabolito 5OH-DCF la reparación fue incompleta. Así, en este caso, el daño residual al ADN fue cercano al 25 % transcurridas 18 h desde el momento de la irradiación.

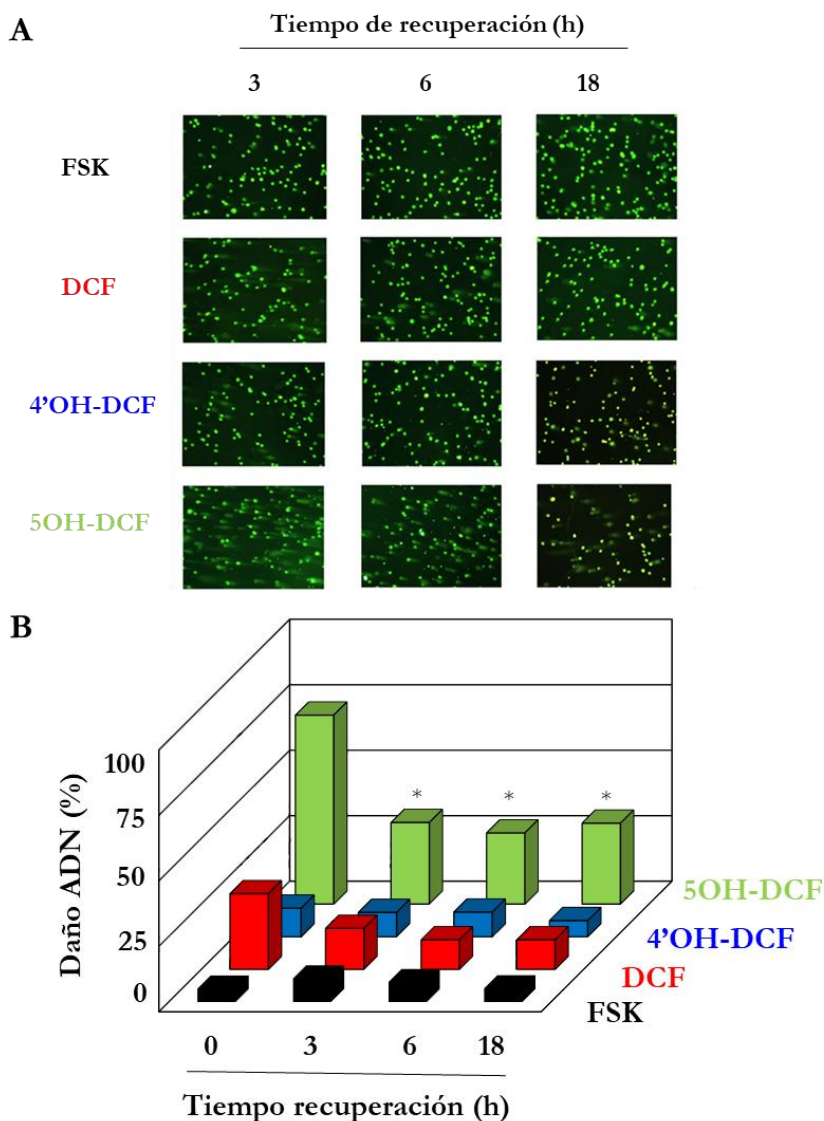


Figura 4.9. Capacidad de reparación del ADN dañado a diferentes tiempos (3 h, 6 h y 18 h) de las células FSK tratadas con DCF y sus metabolitos (100 μ M) en combinación con luz UVA. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo *comet* a diferentes tiempos de recuperación. (B) Porcentaje de ADN dañado determinado con el software *Open Comet* 1.3. Test T-Student: * $p < 0.05$.

4.3. Conclusiones.

La hidroxilación de los anillos aromáticos en las posiciones 4' y 5 tiene lugar durante la biotransformación de Fase I del DCF. Esta alteración induce cambios en el grupo cromóforo del fármaco, modificando así las propiedades de absorción de la luz y de su reactividad fotoquímica. De esta forma, los potenciales fototóxico y fotogenotóxico del DCF, 4'OH-DCF y 5OH-DCF son diferentes, como muestran los diferentes ensayos realizados. El dato más destacado es el aumento de la foto(geno)toxicidad del metabolito 5OH-DCF en comparación con el fármaco original. Además, aunque la mayoría del daño fotosensibilizado al ADN por el DCF y el 5OH-DCF es reparado por las células después de varias horas, esta reparación no es completa en el caso del 5OH-DCF y, por tanto, este daño en el ADN no reparado podría dar lugar a mutaciones en las células.

4.4. Procedimiento experimental.

4.4.1. Reactivos.

El DCF (CAS 15307-79-6) y sus metabolitos 4'OH-DCF (CAS 64118-84-9) y 5OH-DCF (CAS 69002-84-2), la HSA y el ácido linoleico fueron adquiridos en Merck.

4.4.2. Medidas de fluorescencia.

En primer lugar, se prepararon disoluciones de DCF, 4'OH-DCF y 5OH-DCF en PBS a la concentración de 100 μ M. Dichas soluciones (100 μ L) se depositaron en dos placas de 96 pocillos de fondo negro y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 2 h en presencia de 1 mM ácido linoleico, 0.1 mM HSA o células FSK sembradas (8×10^3 células/pocillo).

Transcurrido este tiempo, una de las placas se irradió en el fotorreactor con una dosis de luz UVA de 5 J/cm^2 , mientras que la otra placa se mantuvo en oscuridad. Finalmente, se registró la emisión de la fluorescencia de ambas placas ($\lambda_{\text{exc}} = 320 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$). En todas las medidas se sustrajo la fluorescencia del blanco.

Capítulo 5. Estudio *in vitro* de la foto(geno)toxicidad asociada al fármaco antitumoral lapatinib.

5.1. Introducción.

La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) está compuesta por cuatro receptores: HER1/ErbB1, también llamado EGFR; HER2/ErbB2; HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4 (162-164). Con respecto a su estructura, los receptores son proteínas de membrana con un dominio extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio intracelular, que presenta actividad tirosina-quinasa (Figura 5.1). La unión de los ligandos o agonistas al dominio extracelular de los EGFR induce su dimerización. Como consecuencia, se desencadena la activación del dominio intracelular tirosina quinasa, que se autofosforila e induce también la fosforilación de diferentes sustratos pertenecientes a diferentes rutas de señalización. Estas vías, entre las que se pueden citar la ruta RAS o la ruta de las fosfoinositol 3-quinosas (PI3K), están implicadas en la regulación del crecimiento, motilidad, supervivencia y diferenciación celular (165-167). Su desregulación, y en particular, la sobreexpresión de los receptores EGFR en condiciones patológicas está asociada con frecuencia al desarrollo de procesos tumorogénicos, angiogénesis y metástasis.

Los receptores EGFR constituyen la diana principal de los inhibidores de la actividad tirosina-quinasa (TKIs) mediante la unión reversible o irreversible al dominio intracelular a través del sitio de unión al ATP. En función de su especificidad, los TKIs se subdividen en aquellos con especificidad por un único receptor de la familia EGFR o los inhibidores duales, con capacidad de unión a varios receptores como, por ejemplo, HER1 y HER2 (168).

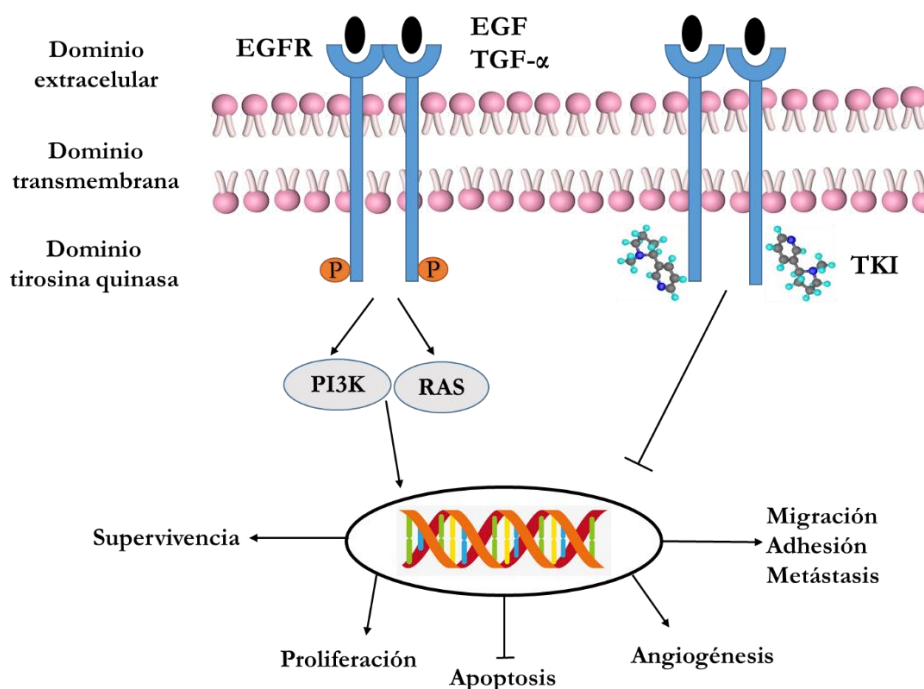


Figura 5.1. Estructura, activación y función de los receptores de la familia EGFR y su modulación por los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKIs).

En este contexto, el fármaco lapatinib (LAP) fue aprobado en 2007 por la FDA para su administración como TKI dual en terapia combinada con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer de mama con metástasis (163, 169-172). En la actualidad su uso se encuentra más extendido para el tratamiento de otros tumores sólidos como el carcinoma de pulmón o páncreas. Además, el LAP también ha mostrado su efectividad en el cáncer de mama triple negativo, que es uno de los más diagnosticados hoy en día (173-175). Con respecto a su metabolismo, el LAP por acción de los citocromos CYP3A4 y CYP3A5 se transforma para dar lugar a varios metabolitos (176). Los principales generados son el derivado *N*-dealquilado

(*N*-LAP) y el derivado *O*-dealquilado (*O*-LAP), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 5.2.

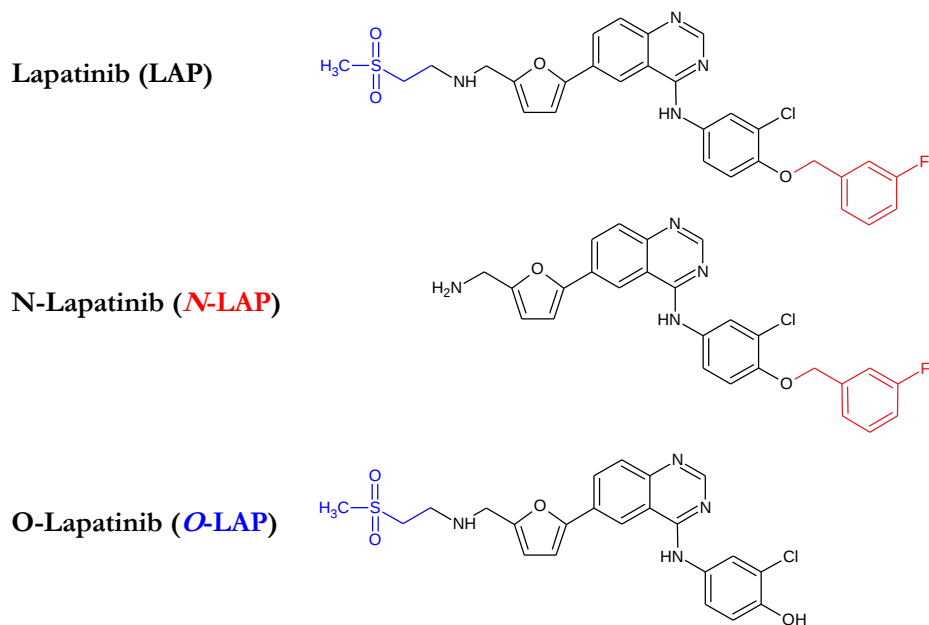


Figura 5.2. Estructuras químicas del lapatinib (**LAP**) y sus metabolitos *N*-lapatinib (***N*-LAP**) y *O*-lapatinib (***O*-LAP**).

Entre las reacciones adversas más frecuentes del fármaco LAP se incluyen hepatotoxicidad, diarrea, prurito, náuseas y alteraciones dermatológicas. En particular, la hepatotoxicidad inducida es de naturaleza idiosincrática y se ha señalado a sus metabolitos como los responsables directos (177, 178), aunque los mecanismos subyacentes son todavía desconocidos. Con respecto a las reacciones cutáneas provocadas por los TKIs, las más frecuentes son erupciones, xerosis o piel seca, cambios en uña y pelo y las reacciones de fotosensibilidad (179). Así, algunos TKIs del receptor BRAF, como el encorafenib o el dabrafenib, han mostrado un elevado potencial

fototóxico en el ensayo *in vitro* de fototoxicidad 3T3 NRU como consecuencia de la formación de $^1\text{O}_2$ y el anión superóxido (180). Además, para algunos fármacos relacionados estructuralmente con el LAP, como por ejemplo el relajante muscular afluoqualona, se han descrito reacciones adversas de fotosensibilidad (181). Con todos estos antecedentes, se planteó como hipótesis la posibilidad que el fármaco LAP tuviera la capacidad para inducir reacciones de fotosensibilidad, las cuales hasta el momento no habían sido caracterizadas. Así, en este capítulo se llevará un estudio *in vitro* de las reacciones de fotosensibilidad asociadas al LAP y la contribución de sus dos principales metabolitos.

5.2. Resultados y discusión.

5.2.1. Internalización celular.

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción UV-VIS del LAP y de sus dos metabolitos N-LAP y O-LAP en un ambiente lipofílico mediante la generación de micelas con el detergente bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), emulando así el ambiente biológico de la membrana plasmática donde se localizan los receptores EGFR diana del fármaco (Figura 5.3A). El espectro de absorción registrado para el LAP reveló que el grupo cromóforo presente en su estructura, un derivado de la quinazolina tiene un máximo de absorción centrado en 380 nm, que solapa con la fracción activa de la luz solar responsable de inducir reacciones de fotosensibilidad. En relación con los espectros de los dos metabolitos, la banda de absorción presente en 380 nm se mantuvo constante, evidenciando así que el grupo cromóforo permanece inalterado en ambos metabolitos.

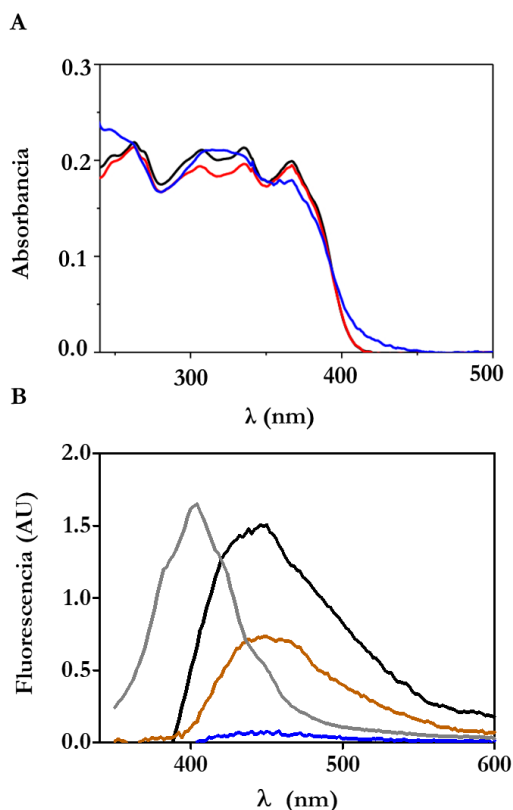


Figura 5.3. (A) Espectros de absorción del **LAP** (negro) y sus metabolitos **N-LAP** (rojo) y **O-LAP** (azul) en micelas de CTAB (5 μ M). (B) Espectros de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) del **LAP**, **N-LAP** y **O-LAP**. Los rendimientos cuánticos (ϕ_F) se determinaron por comparación con el espectro de emisión de fluorescencia del antraceno (gris) en etanol.

A continuación, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia del LAP y sus metabolitos ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) en el interior celular (Figura 5.3B). Para ello, se incubaron los fibroblastos FSK con disoluciones de los compuestos preparadas en PBS. El rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia (ϕ_F) se determinó por comparación de dichos espectros con el espectro de fluorescencia del antraceno, el cual se utilizó como estándar

($\phi_F = 0.27$ en etanol (182)). Así, el LAP mostró un máximo de emisión de fluorescencia centrado en 450 nm con un $\phi_F = 0.25$, valor similar al del antraceno. El metabolito *N*-LAP reveló un espectro de emisión de fluorescencia similar al del fármaco original, con una disminución de su rendimiento cuántico ($\phi_F = 0.12$). Por el contrario, el *O*-LAP apenas mostró fluorescencia en el interior de las células ($\phi_F = 0.01$), lo que sugirió que este metabolito presenta una baja fotoactividad intracelular.

Las propiedades fluorescentes intrínsecas del LAP y de sus metabolitos *O*-LAP y *N*-LAP se utilizaron para investigar su localización intracelular mediante microscopía confocal. Así, todos ellos internalizaron eficientemente en las células FSK como ilustra la fluorescencia verde presente en el interior de las células (Figura 5.4). A pesar de las diferencias en la intensidad de fluorescencia mostrada, tanto el LAP como sus metabolitos presentaron una distribución citoplasmática sin una particular localización en ningún orgánulo de la célula.

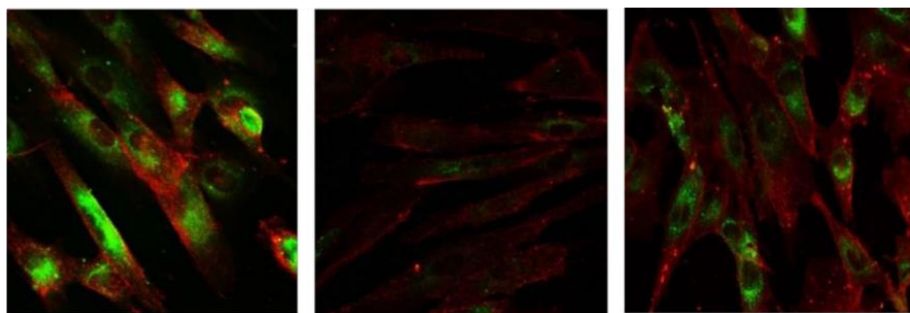


Figura 5.4. Localización intracelular del LAP (izquierda), *O*-LAP (centro) y *N*-LAP (derecha) por microscopía confocal (**fluorescencia verde**). Como marcador de membrana se utilizó el marcador CellMask™ Orange (**fluorescencia roja**).

5.2.2. Estudio de la fototoxicidad.

El potencial fototóxico del LAP y sus metabolitos fue evaluado mediante el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU. Las concentraciones seleccionadas para los tres (LAP, N-LAP y O-LAP) estuvieron dentro del rango 0.1 μM - 100 μM de acuerdo con los ensayos de actividad del fármaco previamente descritos (183). Las curvas dosis-respuesta (Figura 5.5) permitieron estimar los valores de IC₅₀ en condiciones de oscuridad y luz UVA (5 J/cm²) y, a partir de ellas, se calculó el valor del PIF para cada uno de los compuestos (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Fototoxicidad del LAP y sus metabolitos en el ensayo 3T3 NRU.

Compuesto	IC ₅₀ Oscuridad (μM)	IC ₅₀ Luz UVA (μM)	Factor Fotoirritante (PIF) ¹
CPZ	67 $\pm$ 9	3.7 $\pm$ 0.4	18
LAP	21 $\pm$ 4	1.0 $\pm$ 0.3	21
O-LAP	189 $\pm$ 42	231 $\pm$ 39	1
N-LAP	4.0 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.1	8
SDS	225 $\pm$ 32	299 $\pm$ 64	1

Los datos muestran la media junto con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. CPZ y SDS fueron utilizados como control positivo y negativo, respectivamente. ¹Conforme a la Guía N°432 OCDE (2019), PIF<2 indica “No fototoxicidad”; 2<PIF<5 significa “Probable fototoxicidad” y un PIF>5 “Fototoxicidad”.

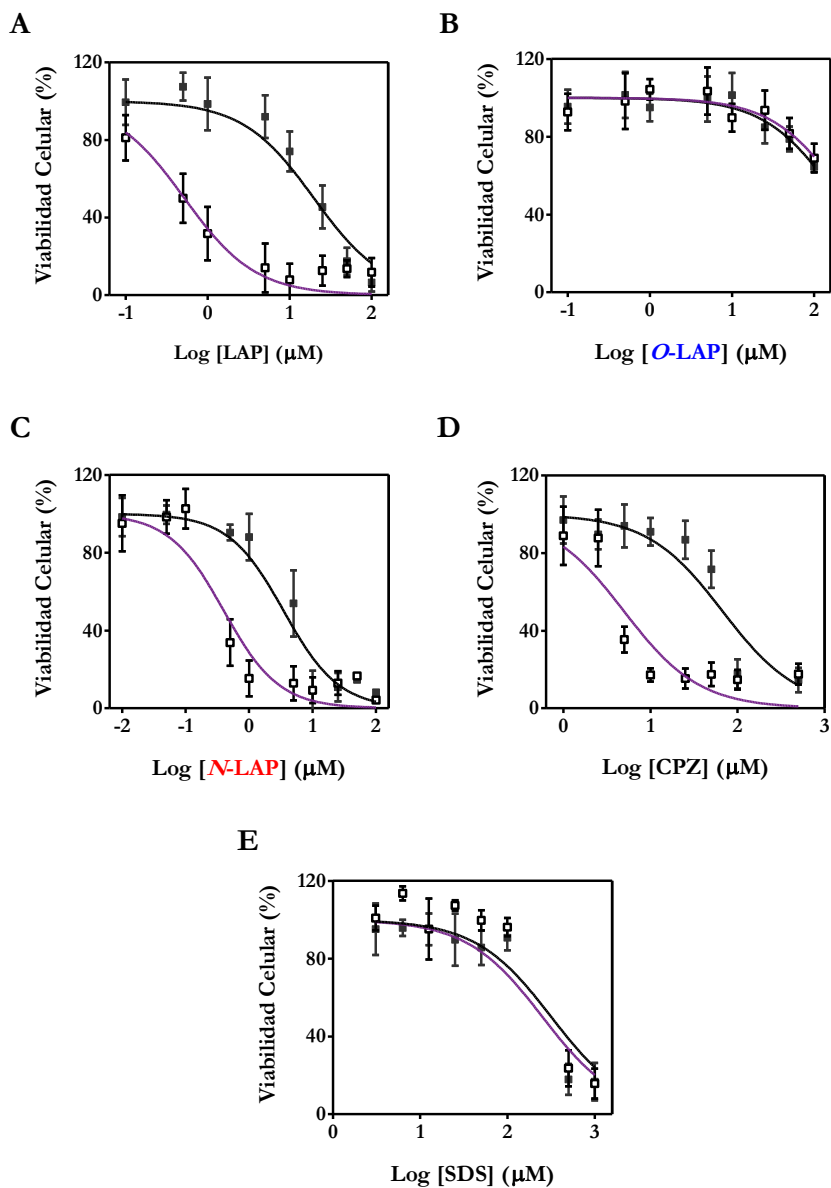


Figura 5.5. Curvas dosis-respuesta de viabilidad celular de células 3T3 tratadas con **LAP** (A), y sus metabolitos **O-LAP** (B) y **N-LAP** (C) en condiciones de oscuridad (**negro**) o irradiadas con luz UVA ($5 \text{ J}/\text{cm}^2$, **violeta**). CPZ (D) y SDS (E) fueron los controles positivo y negativo del ensayo, respectivamente.

Según se observa en la Tabla 5.1, el LAP en condiciones de oscuridad mostró citotoxicidad para las células 3T3 con un valor de IC₅₀ de 21 μ M. Dicha toxicidad se incrementó significativamente en presencia de la luz UVA, disminuyendo la IC₅₀ hasta 1 μ M. Por ello, el LAP es considerado un compuesto fototóxico con un PIF de 21, valor muy similar al obtenido para la CPZ. Por su parte, el metabolito *O*-LAP resultó menos citotóxico que el LAP en oscuridad, con un aumento de la IC₅₀ hasta 189 μ M y no mostró capacidad fotosensibilizante alguna con un PIF igual a 1. La ausencia de fototoxicidad de este metabolito podría estar relacionada con su baja fotoactividad en el interior de la célula, como demostró la baja emisión de fluorescencia en los ensayos de internalización. Con respecto al *N*-LAP, éste reveló una mayor citotoxicidad en comparación con el LAP con un descenso de la IC₅₀ desde 21 μ M a 4 μ M. A pesar de ello, el *N*-LAP mantuvo el potencial fototóxico del fármaco original con un PIF de 8.

En la bibliografía hay descritas numerosas interacciones entre este fármaco y las proteínas. Como se ha señalado en la introducción, el LAP desempeña su actividad farmacológica en las células tumorales a través de la unión a los receptores HER1 y HER2 situados en la membrana plasmática. Además, su transporte en el sistema circulatorio es asistido por proteínas séricas. En particular, estudios fotofísicos previos han señalado que el LAP presenta afinidad por la HSA (184). Por esta razón, las proteínas podrían constituir una diana en los procesos de fotosensibilización inducidos por el LAP. Para corroborar esta hipótesis, se llevaron a cabo experimentos para determinar la fotooxidación de proteínas mediante el método de derivatización de dinitrofenilhidrazina (DNPH) (134) y la HSA como proteína modelo. Este ensayo se basa en la reacción entre los grupos carbonilos de la proteína

oxidada y el DNPH para la formación de aductos estables. Éstos pueden ser fácilmente identificados mediante espectroscopía UV/Vis registrando la absorbancia a 375 nm (ver detalles del experimento en la Sección 5.4.4).

Así, se prepararon soluciones por duplicado de HSA (5 mg/mL) en PBS y se incubaron con el LAP o sus metabolitos *N*-LAP y *O*-LAP (30 μ M) durante 30 min. A continuación, unas se irradiaron con luz UVA (10 J/cm²) y otras se mantuvieron en oscuridad como control negativo. De todas ellas, finalmente se determinó el contenido en grupos carbonilo (Figura 5.6).

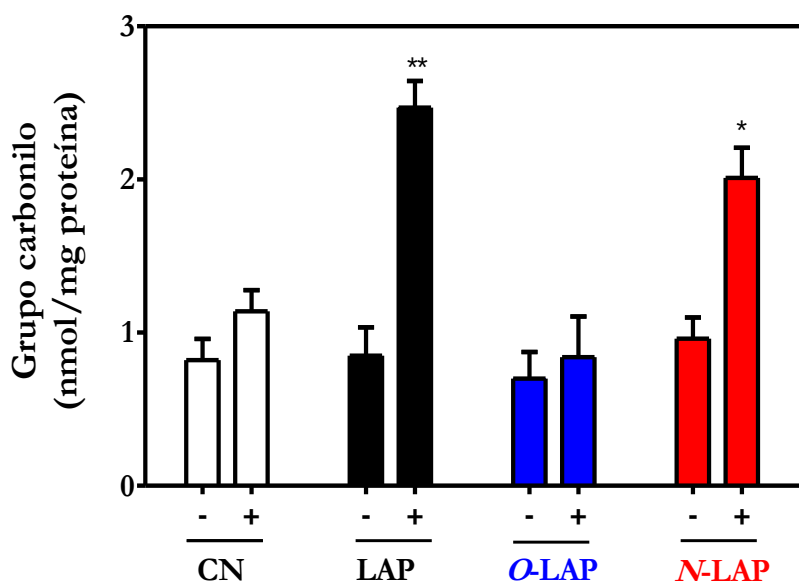


Figura 5.6. Fotooxidación de la proteína HSA por el LAP y sus metabolitos. Las soluciones de HSA (5 mg/mL) en presencia de **LAP**, **O-LAP** y **N-LAP** (30 μ M) fueron irradiadas con luz UVA (10 J/cm², +) o mantenidas en oscuridad (-). La fotooxidación se determinó a través de la cuantificación del grupo carbonilo, por derivatización de DPNH. La gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes. Test T-Student; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Las soluciones control de HSA (CN), en oscuridad o irradiadas, presentaron niveles similares del grupo carbonilo, descartando así un daño oxidativo directo sobre la proteína por acción de la radiación UVA. Según lo esperado, el metabolito O-LAP no mostró daño oxidativo hacia la HSA porque no posee propiedades fotosensibilizantes. Por el contrario, tanto el LAP como el N-LAP incrementaron significativamente la cantidad de grupos carbonilo en la HSA después de la irradiación UVA. Estos datos sugirieron claramente la capacidad de ambos compuestos para mediar la fotooxidación en membranas celulares. Además, el efecto mostrado hacia estas biomoléculas fue superior para el LAP en comparación con su metabolito, en concordancia con los resultados previamente obtenidos en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU.

5.2.3. Estudio de la fotogenotoxicidad.

Para determinar si la fototoxicidad mostrada por el LAP y el N-LAP también involucraba daño al ADN, se llevaron a cabo ensayos de fotoescisión con el plásmido pBR322 para la detección de roturas de cadena simple (SSB), y en combinación con las enzimas de restricción FPG, Endo III y Endo V para detectar modificaciones en las bases nitrogenadas.

La Figura 5.7A muestra la electroforesis en gel de agarosa del plásmido sólo, o tratado con el LAP y sus metabolitos (30 μ M) en condiciones de oscuridad o irradiados con luz UVA (15 J/cm²). A partir de éste, se cuantificó por densitometría el porcentaje relativo de Forma II para cada una de las condiciones ensayadas (Figura 5.7B). Como control positivo de daño se utilizó la CPZ (106).

El LAP como su metabolito O-LAP, con un porcentaje de Forma II inferior al 5 %, no indujeron una conversión efectiva del plásmido pBR322 a su conformación abierta. Por el contrario, el metabolito N-LAP resultó ser fotogenotóxico ya que provocó la formación de SSB en el plásmido de forma significativa con un porcentaje de Forma II calculado cercano al 20 %. Este experimento sugirió que durante el proceso de biotransformación del LAP se forman metabolitos con una capacidad superior para generar daño fotosensibilizado al ADN.

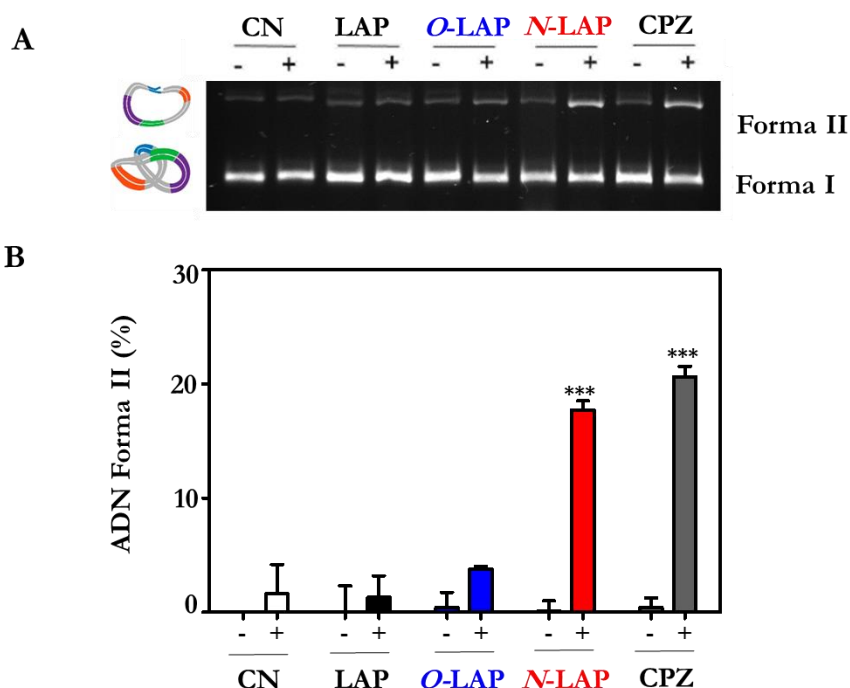


Figura 5.7. (A) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pBR322 (250 ng) sólo (CN) o en presencia de LAP y sus metabolitos O-LAP y N-LAP (30 μ M), en oscuridad (-) o irradiados con luz UVA (+,15 J/cm²). (B) Cuantificación de la formación de la Forma II por densitometría mediante el programa Image-J. La gráfica representa el promedio de 5 experimentos independientes. Test T-Student: *** $p < 0.001$.

Con posterioridad, se llevaron a cabo los experimentos con las enzimas de reparación de bases BER (Endo III, Endo V y FPG), para poder analizar así las posibles alteraciones sobre las bases nitrogenada. Como control positivo, también se utilizó la CPZ, que ha mostrado fotogenotoxicidad a través de la oxidación de púricas, degradación de bases pirimidínicas y formación de dímeros de timina, sin discriminar por ningún tipo de daño en particular (106). Los resultados para cada una de las enzimas de restricción se resumen en la Figura 5.8.

Para las enzimas Endo V (Figura 5.8A) y Endo III (Figura 5.8B) la formación de SSB en el plásmido pBR322 no se vio afectada ni por el LAP ni por sus metabolitos. Para la enzima FPG, la formación de SSB en el plásmido se incrementó significativamente para el metabolito *N*-LAP y permaneció invariable tanto para el LAP como el *O*-LAP (Figura 5.8C). Estos datos apuntan a que el metabolito *N*-LAP, en combinación con la radiación UVA, a diferencia de otros fármacos y/o metabolitos previamente estudiados como la CPZ (106) o el 5OH-DCF (Capítulo 4), discrimina el tipo de daño producido hacia las bases nitrogenadas del ADN, teniendo preferencia por la generación de daño oxidativo a las bases púricas (guanina y adenina). Una vez más, el efecto producido por el metabolito *N*-LAP fue superior al del propio fármaco, indicando una mayor fotogenotoxicidad.

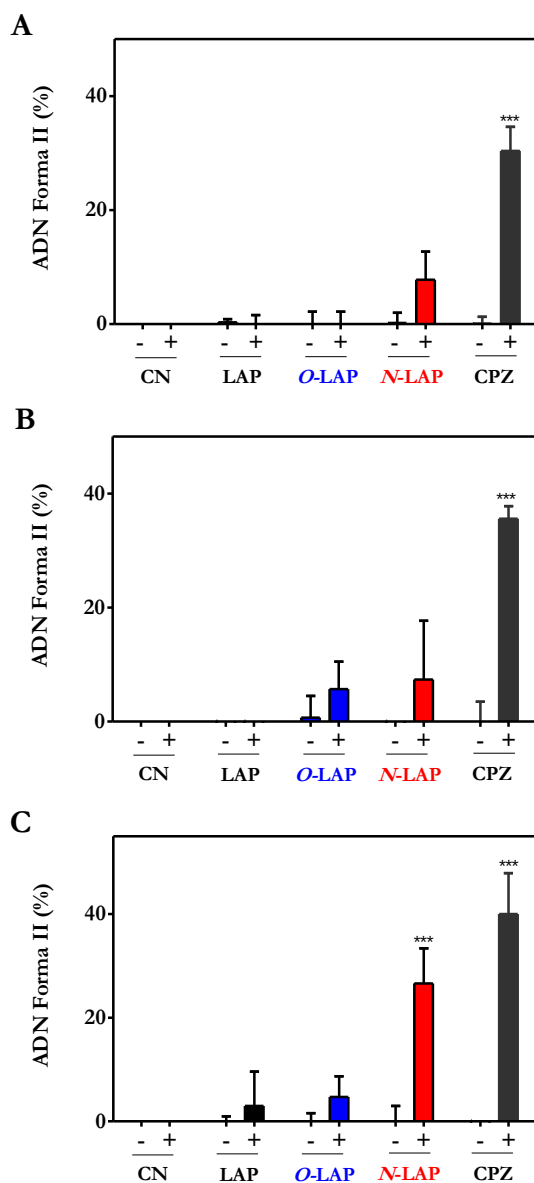


Figura 5.8. Porcentaje de formación de la Forma II del plásmido pBR322 (250 ng) tratado con **LAP** y sus metabolitos **O-LAP** y **N-LAP** (30 μ M) en presencia (+) o ausencia (-) de irradiación UVA (15 J/cm²) mediante digestión con las enzimas Endo V (A), Endo III (B) y FPG (C). La gráfica representa el promedio de 5 experimentos independientes. Test T-Student: ***p<0.001.

Con el fin de verificar estos resultados de fotogenotoxicidad en plásmido, se llevaron a cabo experimentos de daño fotosensibilizado al ADN cromosómico mediante ensayo *comet* en condiciones alcalinas con FSK (Figura 5.9). Éstos se realizaron de forma análoga a los ya expuestos en el Capítulo 4 de la presente tesis para el DCF. En este caso, el porcentaje de daño al ADN para cada una de las condiciones se calculó con la escala visual de seis categorías discretas, y para ello, se analizaron un mínimo de 100 células para cada condición (Figura 5.10) (157).

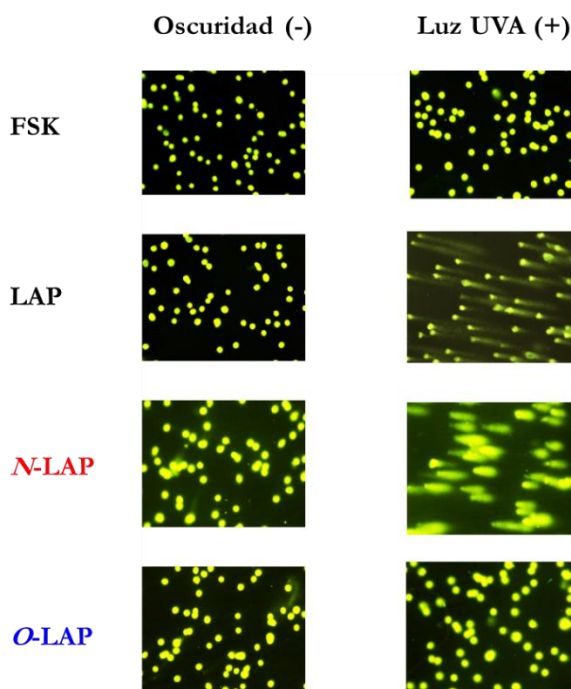


Figura 5.9. Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas del ensayo *comet* para el **LAP**, **N-LAP** y **O-LAP** (30 μ M). FSK: Células FSK no tratadas. Oscuridad: Células no irradiadas. Luz UVA: células irradiadas con Luz UVA (2.5 J/cm²).

En primer lugar, el LAP en combinación con la radiación UVA (2.5 J/cm^2) indujo daño al ADN cromosómico de las células FSK. Así, la microscopía de fluorescencia mostró la aparición de *comets* con colas que presentan una ligera intensidad de fluorescencia con un daño cercano al 35 %. La aparente discrepancia para el LAP entre los resultados obtenidos en este ensayo y los experimentos de fotoescisión con el ADN plasmídico pueden ser explicados por la mayor sensibilidad del ensayo *comet* para detectar daño en el ADN. Como era de esperar, el O-LAP no mostró fotogenotoxicidad, como indican la presencia de nucleoides intactos. Por el contrario, y una vez más, el N-LAP mostró una mayor fotogenotoxicidad que el LAP, con la presencia de *comets* con una mayor intensidad de fluorescencia en la cola, y un daño al ADN calculado próximo al 65 %.

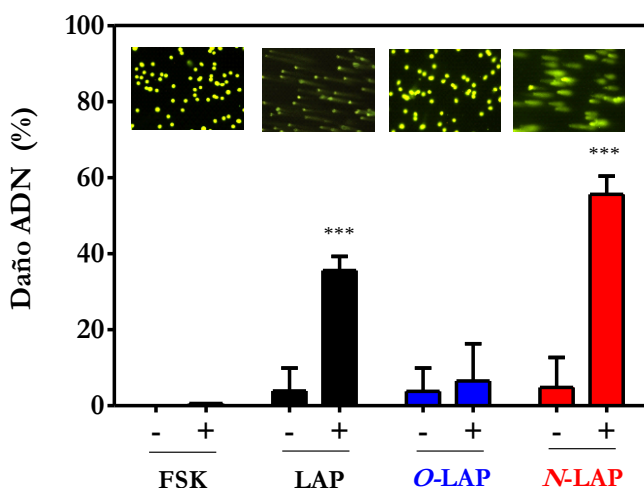


Figura 5.10. Porcentaje de daño en el ADN cromosómico inducido por **LAP**, **N-LAP** y **O-LAP** ($30 \mu\text{M}$) mediante escala visual en oscuridad (-) o irradiadas con luz UVA (+, 2.5 J/cm^2). FSK: células no tratadas. Test T-Student: *** $p < 0.001$. Recuadro superior: Imágenes representativas de la microscopía de fluorescencia de las células irradiadas tratadas con los compuestos.

El daño oxidativo al ADN comprende una gran variedad de lesiones, dando lugar a mutaciones en el genoma si no son reparadas adecuadamente, y a la aparición de carcinogénesis (185). De éstas, una de las más estudiadas es la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) debido a la oxidación de la base guanina, como se ha descrito en la introducción. Así, con el objetivo de corroborar el mayor potencial oxidativo hacia el ADN mostrado por el *N*-LAP en comparación con el fármaco original, se cuantificó la formación de esta lesión mutagénica en el ADN de las células mediante la técnica Elisa, cuyos fundamentos se detallan en la Sección 3.8.

Para ello, las células FSK tratadas con LAP, *N*-LAP y *O*-LAP (30 μ M), fueron sometidas a irradiación UVA (2.5 J/cm²) o mantenidas en oscuridad, e inmediatamente después se realizó la extracción y purificación de su ADN genómico. La calidad de éste en las diferentes muestras fue determinada mediante espectroscopía UV a través del cálculo de la ratio de absorbancias A260/A280. Los valores obtenidos se encontraron dentro de la normalidad (1.8-2.1), permitiendo descartar la degradación del ADN de las células como consecuencia del proceso de irradiación. A continuación, la concentración de 8-oxo-dG en el ADN cromosómico para cada una de las condiciones se determinó mediante el ensayo Elisa de tipo competitivo, interpolando los valores de absorbancia obtenidos en la curva de calibrado elaborada mediante el estándar comercial proporcionado por el fabricante del kit (Figura 5.11). Así, los niveles de 8-oxo-dG en el ADN de las células FSK tratadas con LAP, y *O*-LAP, y posteriormente irradiadas con luz UVA permanecieron constantes (4 nM) y fueron similares a los obtenidos para las células FSK sin tratamiento, control negativo del ensayo. Los resultados estuvieron en concordancia con los ensayos de fotoescisión con la enzima

FPG realizados con anterioridad. Por el contrario, para el metabolito *N*-LAP los niveles de 8-oxo-dG en el ADN de las células FSK irradiadas se incrementaron de una forma significativa hasta alcanzar un valor próximo a 10 nM. Estos resultados confirmaron el rol fundamental de la oxidación de las bases púricas en la fotogenotoxicidad mostrada por dicho metabolito.

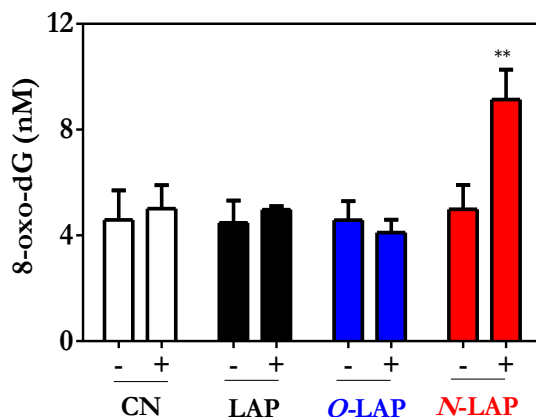


Figura 5.11. Formación de 8-oxo-dG en el ADN genómico de las células FSK no tratadas (CN) o tratadas con LAP o sus metabolitos O-LAP y N-LAP (30 μ M) en oscuridad (-) o irradiadas con luz UVA (+, 2.5 J/cm²). Test-T-Student: **<0.01.

5.3. Conclusiones.

El LAP y su metabolito *N*-dealquilado (*N*-LAP) tienen la capacidad de inducir reacciones de fotosensibilidad. Ambos compuestos son fototóxicos y fotogenotóxicos para las células, como han revelado el ensayo 3T3 NRU y el ensayo *comet*, respectivamente. Por el contrario, su otro metabolito *O*-dealquilado (*O*-LAP) no muestra propiedades fotobiológicas de relevancia. Mientras el LAP muestra su mayor actividad en la oxidación de membranas, el *N*-LAP está asociado con una mayor fotogenotoxicidad, a través de la

oxidación de las bases púricas del ADN. Estos resultados son relevantes en relación con la fotoseguridad del propio fármaco, y ponen de relevancia el importante papel del metabolismo de los fármacos en la determinación de su riesgo fotobiológico.

5.4. Procedimiento experimental.

5.4.1. Reactivos.

El lapatinib (LAP, CAS 231277-92-2) y el antraceno (CAS 120-12-7) se adquirieron en Merck. Los metabolitos *N*-lapatinib (*N*-LAP; CAS 697299-82-4) y *O*-lapatinib (*O*-LAP; CAS 1268997-70-1) se compraron en Santa Cruz Biotechnology y Toronto Research Chemicals, respectivamente. Para la microscopía confocal, los portaobjetos y cubreobjetos de 22 mm diámetro se obtuvieron de VWR; el marcador de membrana CellMask™ Orange fue adquirido a ThermoFisher y el Mowiol 4-88 a Calbiochem.

5.4.2. Medidas de fluorescencia.

Para registrar los espectros de emisión, las FSK fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo negro (8×10^3 células/pocillo) y mantenidas a 37 °C en el incubador de CO₂ durante la noche para favorecer su anclaje a su superficie. Al día siguiente, el medio de cultivo fue reemplazado por soluciones isoabsortivas del fármaco LAP en PBS, o de sus metabolitos *N*-LAP y *O*-LAP, y de antraceno en etanol, usado este último como referencia para el cálculo del rendimiento cuántico de fluorescencia de los compuestos ($\phi_F = 0.27$ en etanol) (182). Los compuestos fueron incubados en el interior del incubador de CO₂ durante 1 h a 37°C para favorecer su internalización

en las células. Transcurrido este tiempo, las soluciones de compuestos se aspiraron de los pocillos, y se realizó un lavado con PBS para eliminar el exceso de compuesto no internalizado. Finalmente, los espectros de fluorescencia se registraron como previamente se ha descrito ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm). El ϕ_F para el LAP y sus metabolitos se calculó mediante la siguiente ecuación $\phi_{F\text{ compuesto}} = \phi_{F\text{ antraceno}} \times \frac{IF_{\text{ compuesto}}}{IF_{\text{ antraceno}}}$, donde IF es la intensidad máxima de fluorescencia del espectro registrado.

5.4.3. Localización celular por microscopía confocal.

Los fibroblastos se sembraron sobre los cubreobjetos de cristal de 22 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se incubaron toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, el medio de cultivo de cada pocillo se reemplazó por 500 μL de solución de fármaco o metabolito en PBS (5 μM), conteniendo el marcador de membranas CellMask™ Orange (dilución 1:20000). Los compuestos se incubaron con las células durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizaron dos lavados con PBS de 5 min para eliminar el exceso de compuesto no internalizado. Inmediatamente después, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con la solución de Mowiol. La visualización de las muestras se realizó en la Unidad de Microscopía del IIS La Fe con el microscopio confocal Leica SP5 en modo secuencial. Las λ_{exc} fueron de 405 nm para los compuestos LAP, N-LAP y O-LAP y de 543 nm para el marcador CellMask™ Orange, mientras que las λ_{em} fueron 450 nm y 567 nm, respectivamente.

Capítulo 6. Daño celular oxidativo fotosensibilizado por el fármaco inhibidor de proteasas simeprevir.

6.1. Introducción.

La infección por el virus de la Hepatitis C (HCV) es un problema de salud de primera magnitud en el continente europeo y, en particular, en los países mediterráneos con una prevalencia estimada entre el 1-3 % (186, 187). La hepatitis C no tratada puede evolucionar en cirrosis y cáncer hepáticos, lo que constituye la primera causa de trasplante hepático. El simeprevir (SIM) es un fármaco macrocíclico que se identificó como un inhibidor reversible del centro activo de la proteasa Ns3/4A del VHC, proteína responsable de la maduración de las proteínas del complejo de replicación del VHC. Su inhibición bloquea la replicación del VHC en hepatocitos (188) (Figura 6.1).

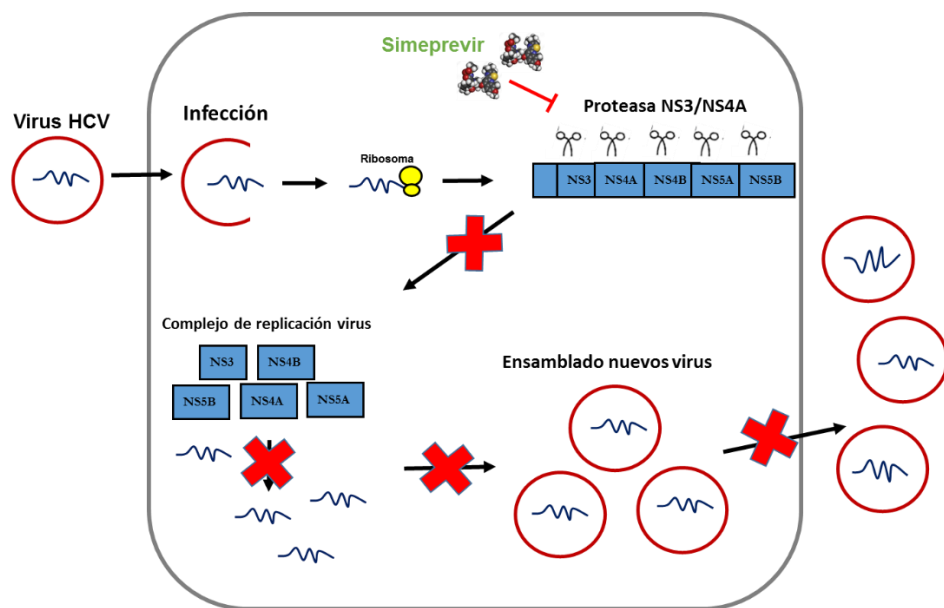


Figura 6.1. Mecanismo de acción del simeprevir (SIM) como antiviral del virus de la hepatitis C (VHC) en hepatocitos humanos. Adaptado de (188).

En el 2013, el SIM fue aprobado por la FDA y EMEA como fármaco oral para el tratamiento de la hepatitis producida por el VHC genotipos 1 y 4, obteniendo elevados porcentajes de curación. Además, el fármaco tiene un perfil de seguridad favorable cuando se administra en combinación con el peginterferón- α /ribavirina o con el sofosbuvir (189-192). Recientemente, el SIM se ha reposicionado como potencial fármaco para el tratamiento de la Covid-19, reduciendo la carga viral del SARS-CoV-2 en varios órdenes de magnitud. Así, el SIM podría inhibir la replicación del coronavirus o de nuevas cepas que puedan derivar del mismo, lo que contribuiría a la resolución de la Covid-19 (193-195).

La pauta de administración recomendada del SIM es diaria con una duración de unas 12 semanas, por lo que la aparición de reacciones adversas en estos pacientes es bastante habitual. Las más frecuentes son sarpullidos, picazón, sensibilidad al sol, dolor muscular, náuseas y dificultad para respirar (189, 196-198). En particular, se han descrito reacciones de fotosensibilidad en estudios de fase III (199).

Con respecto a su metabolismo, aunque el SIM se transforma en el hígado por acción del citocromo CYP3A a través de reacciones de oxidación y dealquilaciones, el SIM inalterado es la forma mayoritaria en la circulación sanguínea (200). De esta forma, un estudio ha relacionado la aparición de efectos secundarios en la piel con la concentración plasmática de SIM a tiempos cortos desde su administración (201), describiéndose la aparición de quemaduras solares de grado 1 en pacientes a partir del primer mes.

En este contexto, el SIM está asociado con la aparición de fototoxicidad, aunque no hay evidencias claras de un incremento del riesgo a sufrir cáncer

de piel (202). Así, el SIM podría actuar como un FS desencadenando una cascada de eventos químicos, responsable en última instancia de las manifestaciones clínicas observadas por consumo del fármaco. Este daño celular podría ocurrir por modificación directa de las biomoléculas o a través de intermedios radicales libres, incluyendo el oxígeno singlete. Como resultado final, las biomoléculas tales como lípidos insaturados, proteínas o las bases de los ácidos nucleicos pueden verse alterados, y si los mecanismos de reparación celulares no actúan eficientemente, pueden provocar daño irreversible para la célula. Por esta razón, es necesario estudiar en profundidad las reacciones adversas de fotosensibilidad del SIM a nivel molecular y celular.

Con todos estos antecedentes, se planteó la hipótesis de que el SIM actuara como un FS eficiente desencadenando reacciones de fotosensibilidad. Esta hipótesis está fundamentada debido a que el espectro de absorción del SIM en PBS se extiende hasta la región UVA, solapando con la parte del espectro de luz solar responsable de las reacciones de fotosensibilidad. Según se observa en la Figura 6.2, el SIM presenta dos máximos centrados en 288 nm y 322 nm correspondientes al cromóforo tiazol-quinolina. Así, después de la absorción de luz por el SIM, se podrían formar reactivos intermedios incluyendo radicales orgánicos y ROS. Estas especies de vida corta podrían ser el origen de las reacciones de fotosensibilidad observadas clínicamente.

Este trabajo se realizó en colaboración con el Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química de la Universidad Politécnica de Valencia, en donde se llevaron a cabo los estudios fotofísicos con el SIM encaminados tanto a la caracterización de sus intermedios reactivos, como a estudiar las bases moleculares de su interacción con las biomoléculas. En este capítulo

de tesis se presentan los resultados obtenidos en los ensayos celulares de las reacciones de fotosensibilidad inducidas por el SIM.

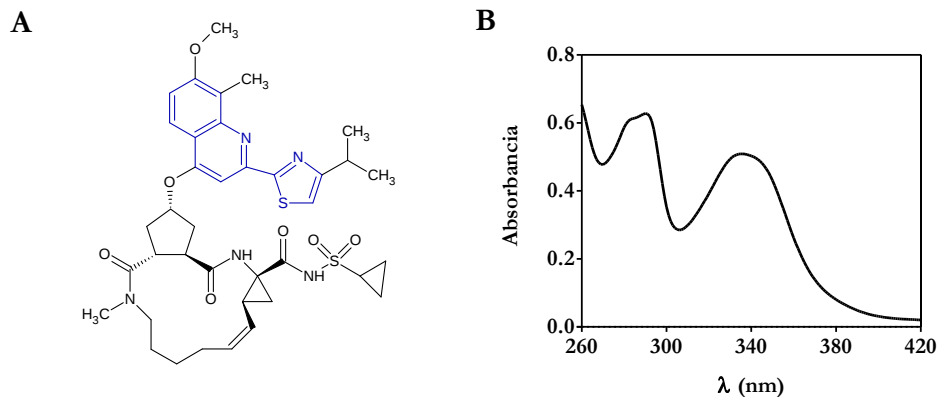


Figura 6.2. (A) Estructura química del antiviral SIM. En color azul se representa el grupo cromóforo tiazol-quinolina. (B) Espectro de absorción realizado en PBS (30 μM).

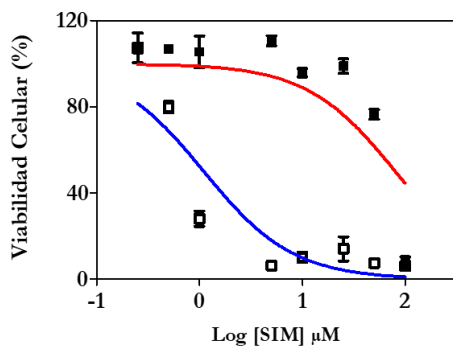
6.2. Resultados y discusión.

6.2.1 Estudio de la fototoxicidad.

La fototoxicidad del SIM se evaluó mediante el ensayo de fototoxicidad 3T3 NRU siguiendo la metodología descrita en la guía 432 de la OECD (131).

Para llevarlo a cabo, los fibroblastos 3T3 fueron tratados con SIM en el rango de concentraciones 0.25-100 μM, y posteriormente irradiados con luz UVA (5 J/cm²) o mantenidos en oscuridad. La viabilidad celular se analizó con el colorante vital rojo neutro para cada condición experimental. De las curvas dosis-respuesta, se estimaron las concentraciones inhibitorias IC₅₀ en condiciones de luz y oscuridad (Figura 6.3).

A



B

IC50 Oscuridad (μM)	IC50 Luz UVA (μM)	Factor Fotoirritante (PIF)
68.6 ± 5.1	1.7 ± 0.2	40

Figura 6.3. (A) Curva dosis-respuesta de viabilidad celular del SIM mediante el ensayo 3T3 NRU en presencia de luz UVA (azul) o condiciones de oscuridad (rojo). (B) Valores de IC50 determinadas en oscuridad, luz UVA y valor del PIF para el SIM. De acuerdo con la Guía de la OCDE, $\text{PIF} < 2$ significa “No fototóxico”; $2 < \text{PIF} < 5$ significa “Probablemente fototóxico” y $\text{PIF} > 5$ “Fototóxico”.

El SIM fue citotóxico para los fibroblastos 3T3 en condiciones de oscuridad con un valor de IC50 de 68 μM . La citotoxicidad se vio notablemente incrementada en combinación con la luz UVA, disminuyendo el valor IC50 hasta 1.7 μM . La fototoxicidad del SIM se determinó mediante el cálculo del PIF, obteniéndose un valor aproximado de 40, ocho veces superior al valor de corte para un compuesto fototóxico de acuerdo a la Guía 432 de la OECD (131). El resultado obtenido con este ensayo podría ayudar a esclarecer el origen de las reacciones de fotosensibilidad observadas en pacientes con VHC en tratamiento con el fármaco. Así, se confirmaría que la elevación de porfirinas no sería el único mecanismo subyacente de la

fotosensibilidad que puede generar el fármaco. Por tanto, los mecanismos de fototoxicidad están asociados con frecuencia a la generación de estrés oxidativo que provoca daños en las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, que en último lugar dan lugar a la muerte celular (185).

6.2.2 Estudio de la fotooxidación de proteínas y lípidos.

Como el fármaco SIM es un compuesto con propiedades lipofílicas, las biomoléculas que componen las membranas celulares (lípidos y proteínas) podrían constituir las principales dianas de su fototoxicidad. Para confirmar esta hipótesis, en primer lugar, se realizó un ensayo de fotoperoxidación con la molécula reportera Bodipy C11 581/591. La molécula consta de un núcleo de difluoruro de dipirrometeno de boro que se encuentra unido por un extremo a un ácido graso y por el otro a un grupo fenilo a través de una cadena de dobles enlaces conjugados (Figura 6.4).

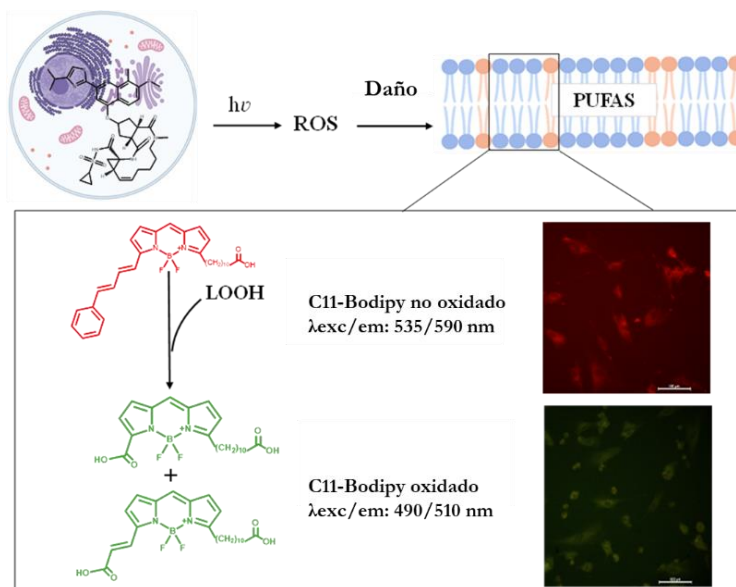


Figura 6.4. Detección de la peroxidación lipídica por el Bodipy C11 581/591.

El ensayo está basado en la capacidad de la molécula de penetrar en la membrana plasmática celular y desplazar su espectro de emisión de fluorescencia cuando se oxida. Así, la forma nativa de la molécula presenta el máximo de emisión en el rojo ($\lambda_{\text{exc}} = 535 \text{ nm}$), el cual se desplaza hacia la región verde ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$), debido a los productos de oxidación formados. Así, según se ha descrito en la bibliografía, el Bodipy C11 581/591 reacciona únicamente con las especies radicales libres formadas a partir de los hidroperóxidos, pero no directamente con los hidroperóxidos (133, 203).

Con esta finalidad, los fibroblastos FSK se trataron con SIM ($5 \mu\text{M}$), y a continuación, se irradiaron con Luz UVA a dosis de 2.5 J/cm^2 . Como control del ensayo, se llevaron en paralelo cultivos celulares mantenidos en oscuridad. Después de la irradiación, las células se marcaron con la molécula reportera Bodipy C11 581/591 para descartar reacciones fotoquímicas directas entre el SIM y el Bodipy. Por último, las células se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia y se tomaron imágenes representativas de cada condición experimental. Las imágenes mostradas en la Figura 6.5 revelaron un incremento de la intensidad de la fluorescencia verde (producto oxidado) en las células tratadas con SIM e irradiadas con luz UVA en comparación con las células no irradiadas. Por el contrario, la peroxidación lipídica en las células no tratadas con SIM fue casi inexistente. En consecuencia, el análisis cuantitativo (Figura 6.6) mostró una reducción significativa de la ratio de intensidad de fluorescencia roja y verde. Estos resultados apoyan la hipótesis inicial de que los lípidos de membrana son una diana en la fototoxicidad del SIM.

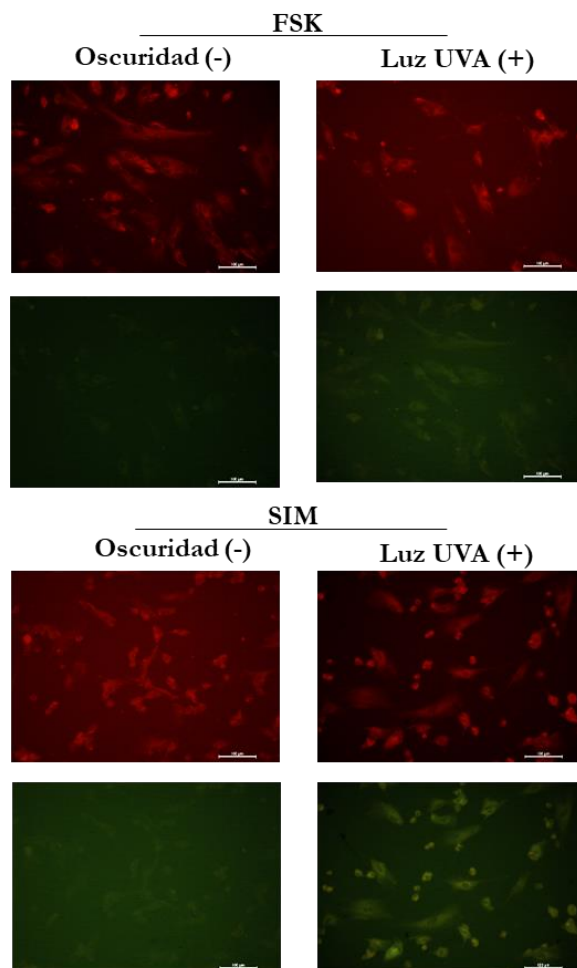


Figura 6.5. Peroxidación lipídica fotosensibilizada por SIM en células FSK. A) Las células sin tratar (FSK) o tratadas con SIM (5 μM) se mantuvieron en oscuridad (-) o se irradiaron con Luz UVA (2.5 J/cm^2 , +). A continuación, las células fueron marcadas con el Bodipy C11 581/591 (10 μM). Las imágenes de microscopía se tomaron para determinar la cantidad relativa de Bodipy en sus formas no oxidada (fluorescencia roja) y oxidada (fluorescencia verde). La intensidad de la forma oxidada es proporcional al grado de peroxidación lipídica en la célula. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Escala: 100 μm .

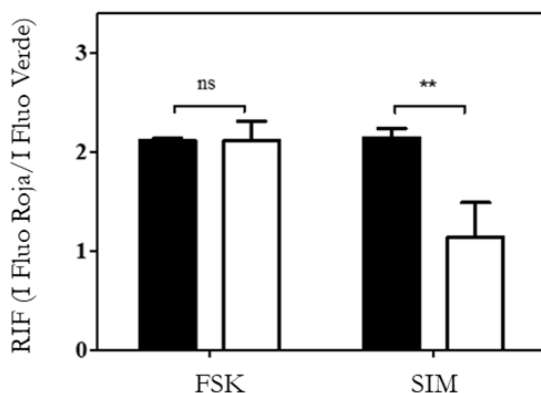


Figura 6.6. Ratio de intensidad de fluorescencia (RIF) entre la forma no oxidada del Bodipy C11 y su forma oxidada en las células. De cada condición se cuantificó la intensidad en al menos 15 células mediante el software Image-J. Test-T-Student: **<0.01 ns: diferencias no significativas.

A continuación, se investigó la capacidad del SIM para fotooxidar proteínas, otras de las biomoléculas que forman parte de las membranas celulares. Para ello, se llevaron a cabo experimentos con la albúmina sérica humana (HSA) como proteína modelo, según se ha explicado en el capítulo anterior de esta tesis. Así, se prepararon soluciones de HSA disuelta en PBS (5 mg/mL) y se incubaron con concentraciones crecientes del fármaco (1, 2.5 y 5 μ M). A continuación, las mezclas se irradiaron en el fotorreactor con una dosis de luz UVA de 10 J/cm² o permanecieron en condiciones de oscuridad, como control negativo del ensayo. A continuación, en todas ellas se cuantificó el grupo carbonilo, mediante el método de derivatización por DNPH. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.7.

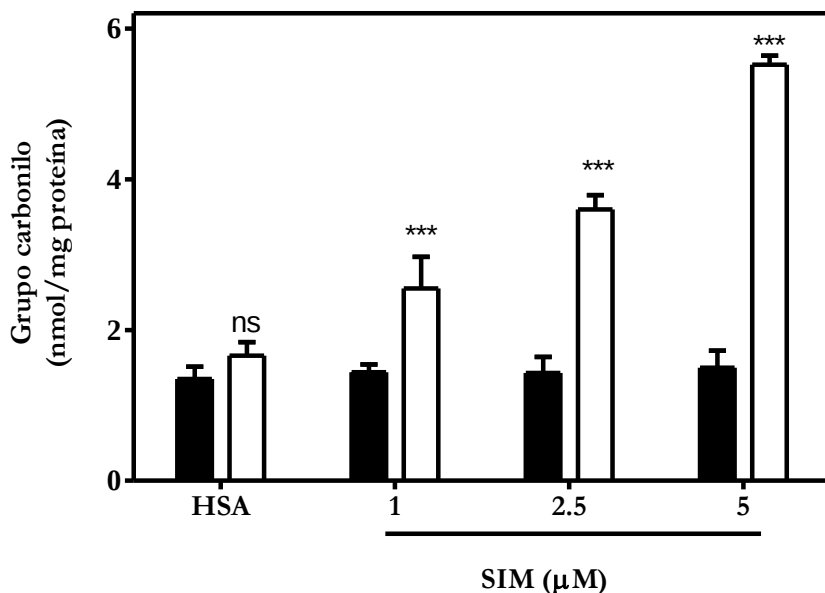


Figura 6.7. Fotooxidación de HSA inducida por SIM. Las soluciones de HSA (5 mg/mL) en presencia de diferentes concentraciones de SIM fueron irradiadas con luz UVA ($10 \text{ J}/\text{cm}^2$, □). La fotooxidación se determinó a través de la cuantificación del grupo carbonilo, por derivatización de DNPH ($\lambda = 375 \text{ nm}$). Las soluciones no irradiadas fueron analizadas como control negativo (■). La gráfica representa el promedio de 3 experimentos independientes. Test T-Student: *** $p < 0.001$; ns: no significativo.

La solución de proteína HSA irradiada sin fármaco presentó la misma concentración de grupos carbonilo que la solución no irradiada, indicando que la dosis de luz UVA seleccionada en el ensayo no indujo la oxidación directa de la HSA. Con respecto al SIM, se observó un aumento del contenido del grupo carbonilo en la HSA en comparación con las mezclas no irradiadas, dependiente de la concentración de SIM. Así, se produjo un incremento máximo de 3 veces en la concentración de grupos carbonilo a

la concentración de 5 μM de SIM. Este ensayo confirmó la capacidad del SIM para inducir la fotooxidación en membranas celulares. De acuerdo con estudios previos en nuestro grupo de investigación sobre fármacos fotosensibilizantes, la formación de grupos carbonilos en la proteína HSA puede estar mediado por la oxidación de los aminoácidos bien mediante un mecanismo de tipo I, que involucra la formación de radicales, como un mecanismo tipo II, siendo la generación de oxígeno singlete la responsable.

6.2.3. Estudio de la fotogenotoxicidad.

Para evaluar si el ADN, otra biomolécula diana del daño oxidativo, podría estar involucrada en el mecanismo de fototoxicidad del SIM, se llevó a cabo un cribado inicial con el plásmido pBR322, sólo y en combinación con enzimas de reparación Endo V, Endo III y FPG (Figura 6.8).

Según se muestra en la figura, el SIM indujo una ligera conversión de la Forma I superenrollada a la Forma II relajada (alrededor del 10 %). Así se sugiere que la formación de SSB no parece ser un mecanismo importante en la fotogenotoxicidad del SIM. Con respecto al efecto de las enzimas de reparación, tanto Endo III como FPG incrementaron la formación de SSB de una forma significativa. En particular, la enzima FPG con un porcentaje cercano al 40 % de la Forma II plasmídica fue la enzima de reparación que presentó un efecto mayor. De acuerdo con la afinidad de las diferentes enzimas de reparación por las diferentes modificaciones químicas en el ADN: Endo V (detección de dímeros de timina), Endo III (productos de degradación de las bases pirimidínicas) y FPG (oxidación de adenina y guanina), el ensayo sugirió que el SIM induce fotogenotoxicidad

principalmente a través de la oxidación de las bases púricas de la molécula de ADN.

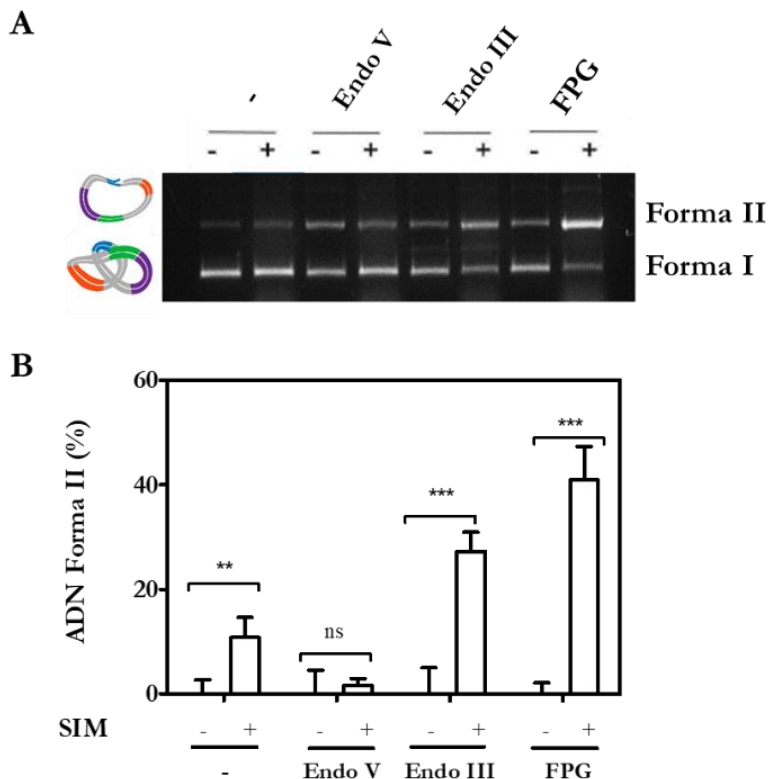


Figura 6.8. (A) Electroforesis en gel de agarosa (1 %) del plásmido pBR322 (250 ng) irradiado en presencia (+) o ausencia (-) de SIM. Adicionalmente, las muestras fueron digeridas con las enzimas de restricción (Endo V, Endo III y FPG). (B) Cuantificación de la formación de la Forma II plasmídica por densitometría. Test T-Student: ns: diferencia no significativa; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

De entre todas las lesiones al ADN producidas por daño oxidativo, una de las más frecuentes es la oxidación del residuo de guanina en la posición C8 para la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG) (204). Esta lesión en el ADN es frecuentemente mutagénica porque si no

es reparada de forma correcta, la base modificada puede emparejar en la doble hebra del ADN no solo con la citosina, sino también con la adenina. El siguiente paso fue el estudio de este proceso en un ambiente celular. Así, se estudió la formación de este biomarcador de daño oxidativo en las células FSK. Para ello, las células se incubaron con el fármaco y se irradiaron en el fotorreactor con una dosis UVA de 2.5 J/cm^2 . A continuación, se realizó la extracción de ADN genómico mediante el uso de un kit de extracción comercial y éste se cuantificó mediante espectroscopia UV ($\lambda=260 \text{ nm}$). La presencia de 8-oxo-dG se detectó mediante un ensayo Elisa competitivo. Según se observa en la Figura 6.9, los niveles de 8-oxo-dG en las células tratadas con el fármaco e irradiadas se duplicaron en comparación con las células no tratadas. Estos resultados vuelven a resaltar el papel destacado que tiene la oxidación de la base guanina en la fotogenotoxicidad inducida por el SIM.

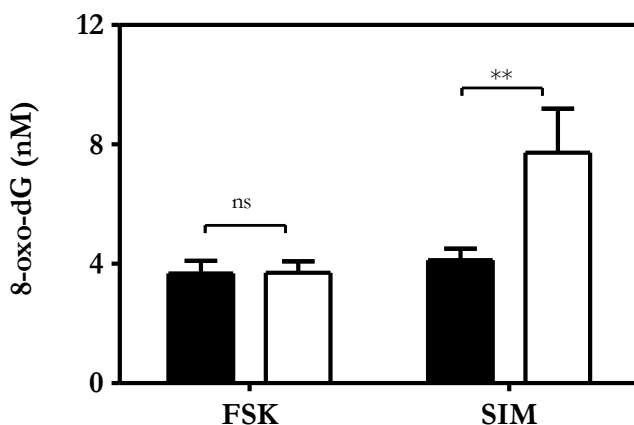


Figura 6.9. Formación de 8-oxo-dG en el ADN genómico de las células FSK tratadas con SIM (2.5 J/cm^2) en oscuridad (■) o irradiadas con luz UVA (□, 2.5 J/cm^2). Test-T-Student: ns: diferencias no significativas; ** $p<0.01$.

Con la intención de describir en detalle otros tipos de fotolesiones al ADN inducidas por el SIM, tales como roturas de cadena simple (SSB), de cadena doble (DSB) o sitios lábiles alcalinos, se llevó a cabo el ensayo *comet* siguiendo la metodología utilizada a lo largo de esta tesis para otros fármacos. Así, la microscopia de fluorescencia indicó que el SIM generó un daño significativo al ADN celular (alrededor de un 40 %), aunque en menor extensión que la CPZ, utilizada como control del ensayo. También, se investigó la capacidad de las células FSK para reparar el daño al ADN generado por el SIM. Para ello, las células tratadas con SIM e irradiadas se incubaron durante diferentes periodos de tiempo hasta un máximo de 20 h para favorecer la activación de la maquinaria celular de reparación del daño al ADN. Transcurrido este periodo de tiempo, se determinó el daño al ADN restante en el cultivo. Como se muestra en la Figura 6.10, mientras que para la CPZ la mayoría del daño fue reparado por las células después de 20 h, obteniendo un 20 % de daño residual, las células no pudieron reparar el daño al ADN generado y éste se mantuvo invariable y constante en un 40 %. Este resultado indica la posibilidad de que el SIM pueda generar mutaciones en el genoma de las células, y en última instancia dar lugar a fotocarcinogénesis.

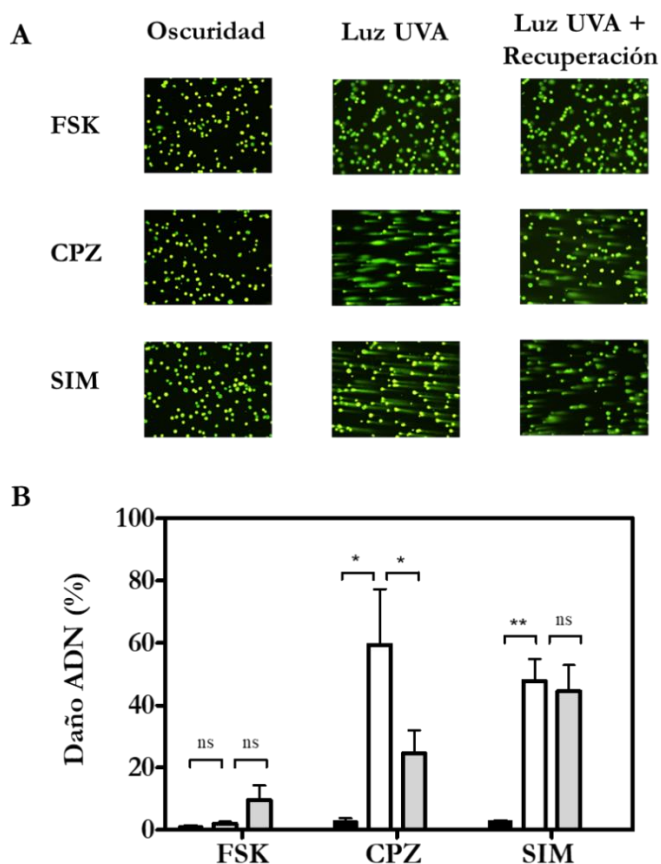


Figura 6.10. Daño fotoinducido al ADN genómico mediante ensayo *comet* en condiciones alcalinas. Las células sin tratar (FSK) o tratadas con SIM (2.5 μ M) o CPZ (10 μ M) se mantuvieron en oscuridad (■), o irradiadas con una dosis 2.5 J/cm² (Luz UVA, □), seguido de un periodo de recuperación celular de 20h (▒). (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia representativas de los ensayos *comet* en condiciones alcalinas. (B) Cuantificación del daño al ADN mediante el sistema la escala visual de 6 categorías. Test T-Student: *p < 0.05; **p < 0.01; ns: diferencias no significativas.

6.2.4. Estudio fotofísico e interacción con biomoléculas.

Los estudios fotofísicos del SIM se llevaron a cabo en el Departamento de Química- Instituto de Tecnología Química de la Universidad Politécnica de Valencia, con la finalidad última de caracterizar sus intermedios reactivos. Así, mediante la técnica de fotólisis de destello láser, se pudo detectar el estado excitado triplete (T_1) como intermedio reactivo del SIM tras su irradiación. Esta especie generada transfiere eficientemente su energía al oxígeno molecular para formar oxígeno singlete (1O_2), especie reactiva de oxígeno responsable de la oxidación de biomoléculas.

Además, se llevaron a cabo experimentos de interacción del SIM con las biomoléculas (lípidos, proteínas y ADN). Los resultados mostraron que el SIM interacciona tanto con los lípidos como con proteínas, pero no se encontraron evidencias de la interacción con el ADN. La formación de 1O_2 fue el proceso predominante en la oxidación de lípidos y ADN, que es característico de mecanismo de fotosensibilización de Tipo II, según se ha explicado en la introducción de esta tesis. Con respecto a la interacción del fármaco con las proteínas, se llevaron a cabo experimentos adicionales con la proteína HSA. En ellos se determinó que el SIM forma un complejo estable con la HSA a través de su sitio de unión III (subdominio IB). Así, en el interior de este complejo, la formación de 1O_2 resultó inferior en comparación al fármaco libre y su intermedio reactivo T_1 del SIM presentó una vida media superior. Por ello, la fotooxidación de proteínas se explicó mejor a través de un mecanismo de fotosensibilización de Tipo I, es decir, de transferencia de energía directa entre el estado excitado y la biomolécula.

6.3. Conclusiones.

El simeprevir (SIM) es un fármaco con capacidad para absorber la radiación en la región UVA del espectro electromagnético, que es la responsable de iniciar las reacciones de fotosensibilidad. El SIM es un fármaco fototóxico, como ha demostrado el ensayo 3T3 NRU, obteniéndose un PIF de 40. El fármaco tiene capacidad para la fotooxidación tanto de lípidos como de proteínas de membrana, como muestran los experimentos de oxidación con la molécula reportera Bodipy C11 581/591 y la proteína HSA. En relación con el daño al ADN, su principal diana es la oxidación de las bases nitrogenadas, como demuestran los ensayos con el plásmido pBR322 en presencia de las enzimas FPG y Endo III, y la generación de 8-oxo-dG en el ADN de las células FSK. Además, la maquinaria celular de reparación de daño al ADN no es capaz de reparar eficientemente el daño fotoinducido por el SIM, lo que podría dar lugar a mutaciones en el genoma de estas células. El intermedio reactivo del SIM es el estado excitado triplete, el cual transfiere eficientemente su energía al oxígeno para la formación de $^1\text{O}_2$. Este es el responsable de la oxidación de lípidos y ADN a través de un mecanismo de Tipo II. En presencia de HSA, se forma un complejo estable SIM@HSA a través del sitio III de unión. En él, la desactivación por oxígeno del estado excitado triplete no es tan efectiva, formándose en menor proporción $^1\text{O}_2$, por lo que el mecanismo Tipo I es el predominante en la oxidación de proteínas. Globalmente, estos resultados son la primera evidencia del efecto directo del SIM sobre las reacciones adversas descritas en la bibliografía para este fármaco, y son relevantes para el establecimiento de medidas de fotoprotección adecuadas en los pacientes con VHC que se deban someter a este tratamiento.

6.4. Procedimiento experimental.

6.4.1. Reactivos.

El Simeprevir (SIM, CAS 923604-59-5) fue adquirido en MedChemExpress.

6.4.2. Ensayo de peroxidación lipídica fotoinducida.

El ensayo celular de fotoperoxidación lipídica se llevó a cabo con el ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3 undecanoico, también conocido como Bodipy C11 581/591. Este compuesto actúa como molécula reportera en células vivas porque modifica su emisión de fluorescencia de la región roja a la región verde cuando se oxida (45, 133). Para ello, se sembraron fibroblastos humanos FSK en dos placas de 12 pocillos a una densidad de 6.0×10^4 células/pocillo. Al día siguiente, las células se trataron con SIM (5 μ M) y se incubaron durante 30 min en oscuridad a 37°C. A continuación, una de las placas se irradió en el fotorreactor (2.5 J/cm²) y la otra se mantuvo en oscuridad, como control negativo del ensayo. Seguidamente, las células se marcaron con el Bodipy C11 581/591 (10 μ M) durante 30 min a 37°C. Los cultivos se visualizaron con el microscopio Leica DMI 4000B para detectar ambas formas de la molécula reportera. La forma no oxidada (fluorescencia roja) se detectó con una $\lambda_{em} = 535$ nm, mientras que la forma oxidada (fluorescencia verde) con una $\lambda_{em} = 490$ nm. El grado de peroxidación lipídica de las células en cada condición, se cuantificó mediante el software Image-J, la intensidad de fluorescencia en cada uno de los canales. Por último, se calculó la ratio de intensidad de fluorescencia (RIF) mediante la ecuación

$$RIF = \frac{I \text{ fluorescencia roja}}{I \text{ fluorescencia verde}}$$

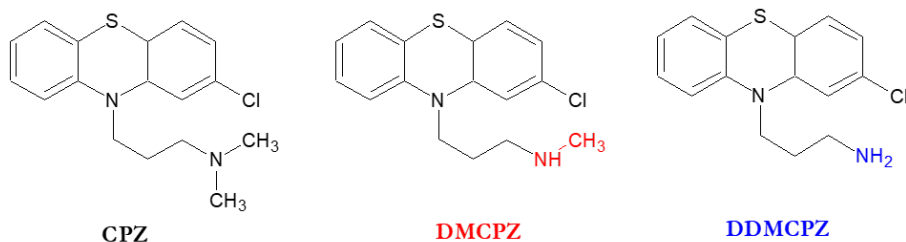
Capítulo 7. Estudio de la fotomutagenicidad inducida por el ansiolítico clorpromazina y sus metabolitos *N*-demetilados

7.1. Introducción.

La clorpromazina (CPZ) es un fármaco antipsicótico que posee propiedades ansiolíticas e inhibe el receptor D2 de la dopamina. Pertenece a la familia de las fenotiazinas y en la práctica clínica está indicado para el tratamiento de trastornos psicóticos como la esquizofrenia o el trastorno bipolar (205). Entre las reacciones adversas del fármaco, las reacciones de fotosensibilidad han sido ampliamente caracterizadas e incluyen tanto fototoxicidad como fotoalergia (104, 206-208). Su metabolismo también ha sido estudiado en detalle a partir de muestras de orina de pacientes psiquiátricos. Algunos de los metabolitos de fase I del fármaco incluyen aquellos generados por demetilación de la CPZ como la demetilclorpromazina (DMCPZ) y la didemetilclorpromazina (DDMCPZ), que conservan inalterado el grupo cromóforo fenotiazina respecto a la CPZ con unos máximos de absorción alrededor de 250 nm y 300 nm como se observa en la Figura 7.1.

Una investigación previa en el grupo de investigación se centró en el estudio de las reacciones de fototoxicidad inducidas por la CPZ y sus metabolitos a nivel celular y molecular (106). En ella, se concluyó que ambos metabolitos demetilados, DMCPZ y DDMCPZ, mostraron mayor fototoxicidad que la CPZ en el ensayo 3T3 NRU y mayor fotogenotoxicidad en el ensayo *comet*. En relación con los experimentos fotofísicos realizados, se observó el mismo patrón de fotorreactividad entre los metabolitos y la CPZ, que se caracteriza por una fotodehalogenación y la formación del intermedio radical aril reactivo. Sin embargo, el tiempo de vida medio del estado excitado triplete fue superior para los metabolitos DMCPZ y DDMCPZ en comparación con la CPZ. Este resultado experimental explicaría el mayor grado de daño observado a nivel celular por ambos metabolitos.

A



B

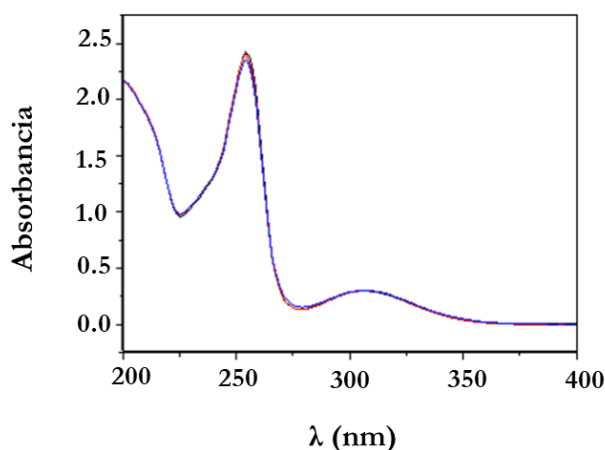


Figura 7.1. (A) Estructura química de la clorpromazina (**CPZ**) y sus metabolitos **DMCPZ** y **DDMCPZ**. (B) Espectros de absorción de **CPZ** (negro), **DMCPZ** (rojo) y **DDMCPZ** (azul) en PBS (10 μ M).

En relación con los experimentos de fotogenotoxicidad, la inducción de daño en el ADN cromosómico en la célula por un fotosensibilizador desencadena la activación de los sistemas endógenos de reparación BER y NER. No obstante, si el daño no se repara de una forma eficiente, puede dar lugar a la aparición de mutaciones en aquellas regiones cromosómicas afectadas (185, 209). La acumulación de mutaciones puede desencadenar la activación de los procesos de muerte celular programada en la célula. No

obstante, si las mutaciones se acumulan en oncogenes o genes supresores de tumores, así como sus regiones reguladoras la aparición de procesos carcinogénicos podrían verse favorecidos. Los resultados obtenidos en los ensayos *comet* de daño fotoinducido al ADN no necesariamente se deben correlacionar con los resultados obtenidos en un experimento de mutagénesis. Mientras que el ensayo *comet* detecta principalmente roturas tanto de cadena simple como dobles en la hélice de ADN, es decir moléculas de ADN que no han sido reparadas por la maquinaria celular, un ensayo de mutagénesis identifica aquellas reparaciones erróneas en la secuencia del ADN.

Para el estudio de la mutagenicidad en la actualidad, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), también denominadas de alto rendimiento, son una herramienta muy útil (210-212). Así, permiten la detección precisa de mutaciones en un determinado gen porque la cobertura o profundidad de la secuenciación, es decir, el número de lecturas únicas de un nucleótido para una posición en el gen analizado es elevado. Además, la NGS se trata de una técnica fácilmente estandarizable a un precio asequible para los laboratorios de investigación.

En este contexto, en este capítulo de tesis se pretende comparar el ensayo *comet* con las técnicas de NGS como herramientas para evaluar la posible fotomutagenicidad de un fármaco con propiedades fotosensibilizantes. Este estudio piloto comparativo entre ambas técnicas se ha llevado a cabo con la CPZ, fármaco con propiedades foto(genoto)tóxica, junto con los metabolitos demetilados DMCPZ y DDMCPZ.

7.2. Resultados y Discusión.

7.2.1. Estudio de la reparación del daño al ADN.

Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación mostraron mediante el ensayo *comet* que ambos metabolitos demetilados de la CPZ (DMCPZ y DDMCPZ) resultaron ser más fotogenotóxicos que el propio fármaco. Así, este mayor efecto biológico en los metabolitos se explicó por las propiedades de la cadena lateral de naturaleza alquílica presente tanto en la CPZ como en sus metabolitos. A menor grado de metilación de dicha cadena lateral, la vida media del estado excitado triplete era superior (106).

Tomando como punto de partida estos resultados, se investigó la capacidad de las células FSK para reparar el daño fotosensibilizado al ADN inducido por la CPZ y sus metabolitos. Para realizar estos ensayos, las células FSK se trataron con el fármaco o con los metabolitos (10 μ M) y, posteriormente se irradiaron con luz UVA (2.5 J/cm²) o se mantuvieron en oscuridad. Como control positivo se utilizó el KP. Una vez irradiadas las células, éstas se incubaron en medio de cultivo fresco durante 3 y 6 h para que la maquinaria celular para la reparación del ADN se activara. Transcurrido este tiempo, las células fueron lisadas y el daño en el ADN no reparado se analizó y cuantificó mediante ensayo *comet* (Figura 7.2).

En primer lugar, como se muestra en las imágenes realizadas de microscopía de fluorescencia y en concordancia con los resultados previos, el daño fotosensibilizado en el ADN cromosómico fue mayor en los metabolitos en comparación con el fármaco CPZ. Así, mientras que éste indujo un daño al ADN cercano al 70 %, el daño generado por los metabolitos demetilados DMCPZ y DDMCPZ fue superior y aproximadamente del 85 %.

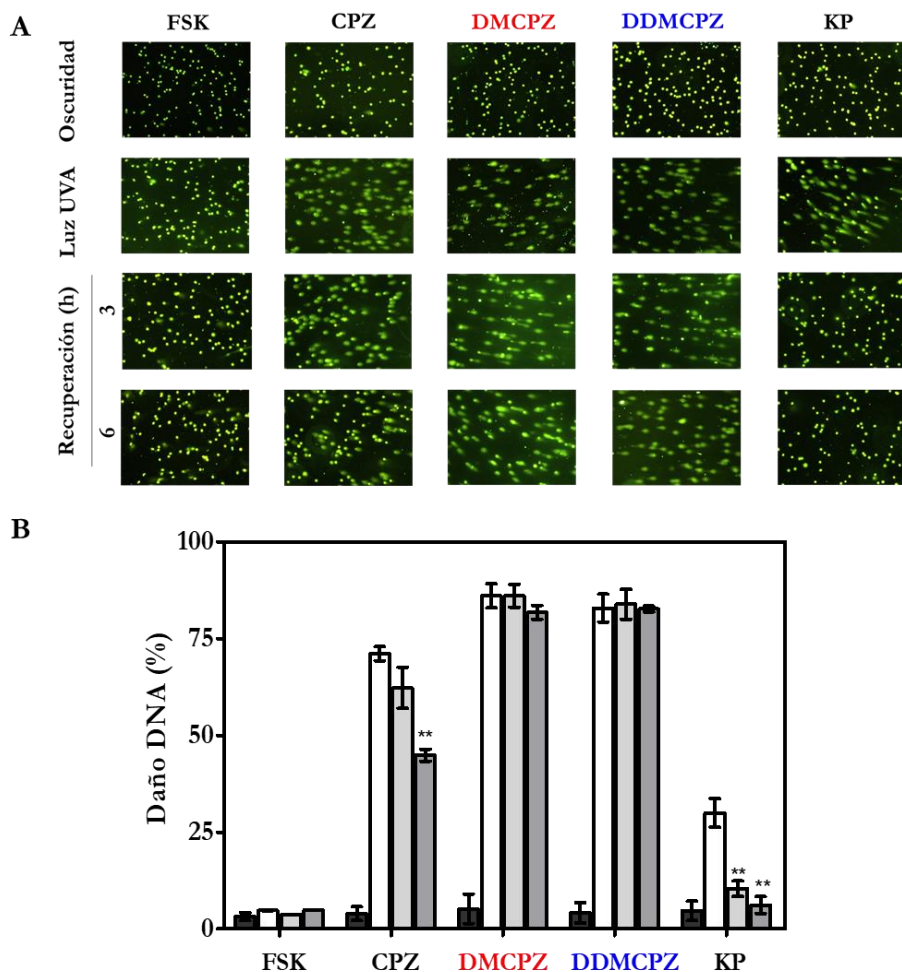


Figura 7.2. Ensayo *comet* en condiciones alcalinas de células FSK solas (FSK) o tratadas con **CPZ**, **DMCPZ** y **DDMCPZ** (10 μ M) e irradiadas con luz UVA (2.5 J/cm²). Como control del ensayo se utilizó el compuesto ketoprofeno (KP, 10 μ M). Las células se mantuvieron en oscuridad (■), o fueron irradiadas con Luz UVA (2.5 J/cm², □), seguido de un periodo de recuperación celular de 3 h (▨) y 6 h (▩). (A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de los experimentos *comet*. (B) Porcentaje de daño al ADN calculado mediante la clasificación visual de 6 categorías para cada condición experimental. Test T-Student; ** $p < 0.01$.

Por otra parte, tras dejar las células en incubación durante 3 h y 6 h para que los sistemas de reparación del ADN dañado BER y NER pudieran actuar para reparar el daño generado, éste sólo se redujo de una forma significativa conforme aumentó el tiempo de recuperación para el caso de la CPZ. Por el contrario, éste se mantuvo invariable para la DMCPZ y la DDMCPZ. La cuantificación del daño fotosensibilizado al ADN mediante la escala visual reveló que para la CPZ las células repararon el daño de forma efectiva hasta reducir su valor al 40 % trascurridas 6 h desde el momento de la irradiación. En cambio, con ambos metabolitos demetilados, éste permaneció en todo momento constante en el 85 %, por lo que no se produjo una activación efectiva de los mecanismos celulares de reparación del daño al ADN.

7.2.2. Estudio de la fotomutagenicidad mediante secuenciación de nueva generación (NGS).

Los estudios de fotomutagenicidad mediante NGS se realizaron mediante una colaboración con el profesor José A. García-Agúndez del Instituto Universitario de Biomarcadores de Patologías Metabólicas y Moleculares de la Universidad de Extremadura. Para ello, las células FSK se trataron con la CPZ, DMCPZ o DDMCPZ, y posteriormente se irradiaron en las mismas condiciones que las previamente utilizadas en los ensayos *comet* (2.5 J/cm²). Para cada uno de los cultivos, se recolectaron las células y se realizó una extracción y purificación de ADN genómico. La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante la tecnología de la secuenciación dirigida profunda y abarcó una región cromosómica de un tamaño de 24830 bp, repartidos en 167 amplicones. Esta región a secuenciar incluyó los genes supresores de tumores *BRC41* y *BRC42*, implicados en el desarrollo de diferentes tipos

de cáncer como el de mama (213, 214). La profundidad media de lectura para cada nucleótido de la región fue siempre superior a 340. El control de calidad obtenido de la secuenciación se resume en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Control de calidad de la secuenciación NGS de las muestras.

Muestra	Número lecturas	Número bases (mbp)	Profundidad media	Cobertura (%)
FSK Oscuridad	57750	8.3150	363.15	100
FSK Luz UVA (2.5 J/cm²)	55302	7.8122	341.58	100
CPZ Oscuridad	71217	10.2638	448.05	100
CPZ Luz UVA (2.5 J/cm²)	79209	11.3726	496.37	100
DMCPZ Oscuridad	83100	12.0291	525.74	99.82
DMCPZ Luz UVA (2.5 J/cm²)	87788	12.5787	549.36	99.98
DDMCPZ Oscuridad	88685	12.7070	541.75	100
DDMCPZ Luz UVA (2.5 J/cm²)	86673	12.4188	542.69	100

El análisis de la región cromosómica secuenciada en las muestras del estudio incluyó 13 regiones polimórficas conocidas o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), cuyas características en las células FSK se resumen en la Tabla 7.2. De dichas regiones, para la evaluación de la fotomutagenicidad de la CPZ y sus metabolitos únicamente se consideraron aquellas encontradas en heterocigosidad en las células FSK, es decir, 7 en total. Para cada SNP, se estimó la tasa de mutagenicidad como la diferencia del porcentaje de heterocigosidad determinado entre el ADN de las células

tratadas e irradiadas con Luz UVA (2.5 J/cm^2) y el ADN de las células tratadas pero mantenidas en oscuridad. Para cada compuesto, la tasa de mutagenicidad global se calculó mediante la media de las diferencias de heterocigosidad obtenidos para los 7 SNPs (Figura 7.3.).

Tabla 7.2. Características de las regiones polimórficas analizadas mediante NGS. Las localizaciones cromosómicas se corresponden al ensamblaje GRCh37.

Posición cromosómica	Código SNP	Hetero cigosidad	% Hetero cigosidad	Alelos
chr13:32907420	rs397507608	No	-	-
chr13:32907615	-	Sí	49.12 ± 3.36	A/ATATCT
chr13:32912299	rs543304	Sí	51.65 ± 3.72	C/T
chr13:32912345	rs80359406	No	-	-
chr13:32913055	rs206075	Sí	49.42 ± 1.75	C/T
chr13:32915005	rs206076	Sí	48.55 ± 2.47	C/G
chr13:32929387	rs169547	Sí	48.21 ± 2.66	C/T
chr13:32944741	rs11571744	Sí	48.24 ± 2.94	C/T
chr13:32954302	-	No	-	-
chr13:32968808	-	No	-	-
chr17:41244936	rs799917	Sí	49.37 ± 2.56	T/C
chr17:41245586	-	No	-	-
chr17:41276170	-	No	-	-

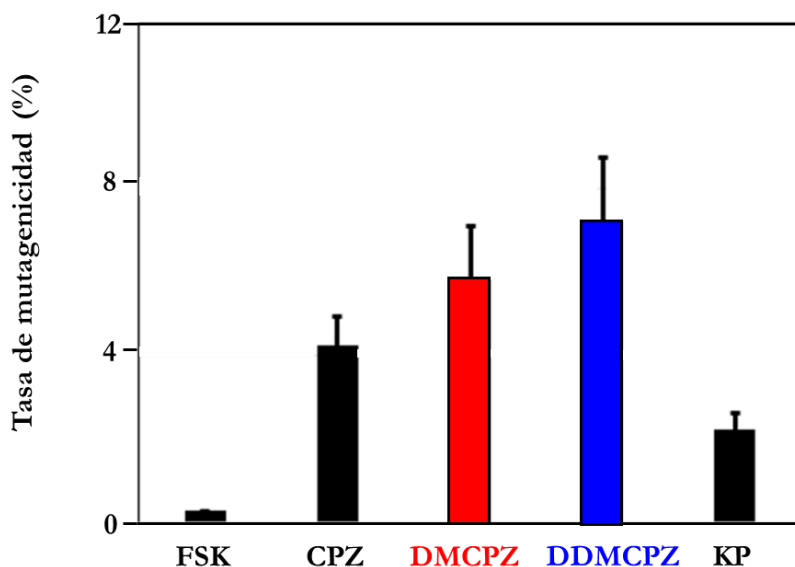


Figura 7.3. Fotomutagenicidad inducida por la **CPZ** y sus metabolitos **DMCPZ** y **DDMCPZ** en las células FSK analizada mediante NGS. Como control positivo, se utilizó el KP. Los resultados representan la media $\pm$ DE del incremento de heterocigosidad de los 7 SNPs encontrados en heterocigosidad en las células FSK.

La tasa de fotomutagenicidad determinada mediante NGS para la CPZ y sus metabolitos mostró una tendencia similar a los resultados obtenidos en los ensayos *comet* de reparación del ADN. Así, para las células FSK no tratadas se obtuvo una baja tasa de mutagenicidad, indicando que la dosis de radiación UVA empleada en estos experimentos no provocó mutaciones en los SNPs analizados. Para la DMCPZ y DDMCPZ se obtuvo una tasa de fotomutagenicidad superior en comparación a la propia CPZ y al KP, utilizado como control positivo de este ensayo. Cabe resaltar que para el metabolito DDMCPZ, mientras que en los ensayos de recuperación por *comet* mostró un nivel de reparación del ADN similar al DMCPZ, en los experimentos NGS se observó una tasa superior de fotomutagenicidad, lo

que podría estar relacionado con una mayor sensibilidad de la técnica. La comparación de los resultados obtenidos por ambas técnicas, aun teniendo en cuenta esta pequeña discrepancia, reveló un coeficiente de correlación de Pearson (valor R) elevado de 0.953. Esto sugiere que ambas metodologías son complementarias y que, en el caso de la técnica NGS, ésta presenta un gran potencial como herramienta alternativa al ensayo *comet* porque al ser más sensible podría mostrar una mayor capacidad de discriminación una vez se ha alcanzado un elevado nivel de daño al ADN.

7.3. Conclusiones.

La combinación de los experimentos de recuperación mediante ensayo *comet* en condiciones alcalinas con la secuenciación NGS se ha aplicado con éxito para la determinación de la capacidad fotomutagénica de la clorpromazina y de sus metabolitos demetilados de fase I DMCPZ y DDMCPZ. El ensayo *comet* ha demostrado que la CPZ produce daño fotosensibilizado al ADN, que es parcialmente reparado por las células después de varias horas desde la irradiación. Por el contrario, sus metabolitos indujeron un daño superior que la maquinaria celular no pudo reparar de forma efectiva bajo las mismas condiciones experimentales. Además, la secuenciación NGS ha permitido calcular la tasa de fotomutagenicidad mostrando la misma tendencia, a excepción de pequeñas discrepancias para el metabolito DDMCP, en donde la secuenciación NGS mostró mayor sensibilidad. Este estudio es el primero en demostrar la utilidad de la secuenciación NGS para la determinación de la mutagenicidad inducida por un fármaco fotosensibilizador como es la CPZ y sus principales metabolitos.

7.4. Procedimiento experimental.

7.4.1. Reactivos.

El fármaco CPZ (CAS 69-09-0) y el (*S*)-Ketoprofeno (KP) se adquirieron en Merck. Los metabolitos DMCPZ (CAS 1225-64-5) y DDMCPZ (CAS 2095-17-2) se sintetizaron mediante técnicas estándares (106) en el Instituto de Tecnología Química, centro mixto del CSIC y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV).

7.4.2. Secuenciación masiva de nueva generación (NGS).

Las células FSK se sembraron en 2 placas de 6 pocillos (2×10^6 células/pocillo). Las células se incubaron con soluciones 10 μ M en PBS de CPZ, DMCPZ, DDMCPZ y KP durante 30 min a 37°C. A continuación, una de las placas se irradió con luz UVA (2.5 J/cm²) mientras que la otra placa se conservó en oscuridad. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min y el pellet celular fue recogido y congelado a -20°C.

La extracción y purificación del ADN se realizó mediante la extracción en fenol / cloroformo / alcohol isoamílico y precipitación en etanol. El ADN purificado fue resuspendido en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.0, 1 mM EDTA a una concentración final entre 400-600 μ g/mL y guardado a 4°C en viales de plástico estériles. Los estudios de mutagénesis se llevaron a cabo mediante la técnica de secuenciación profunda dirigida (Ion PGM Targeted Sequencing, Life Technologies). Los genes seleccionados para el análisis de la mutagenicidad fueron BRCA1 y BRCA2 basándose en la facilidad para su secuenciación y a la alta cobertura de la región en los análisis. La región analizada cubrió 24830 pares de bases, 167 amplicones y la cobertura media para cada base nitrogenada fue de al menos 340x.

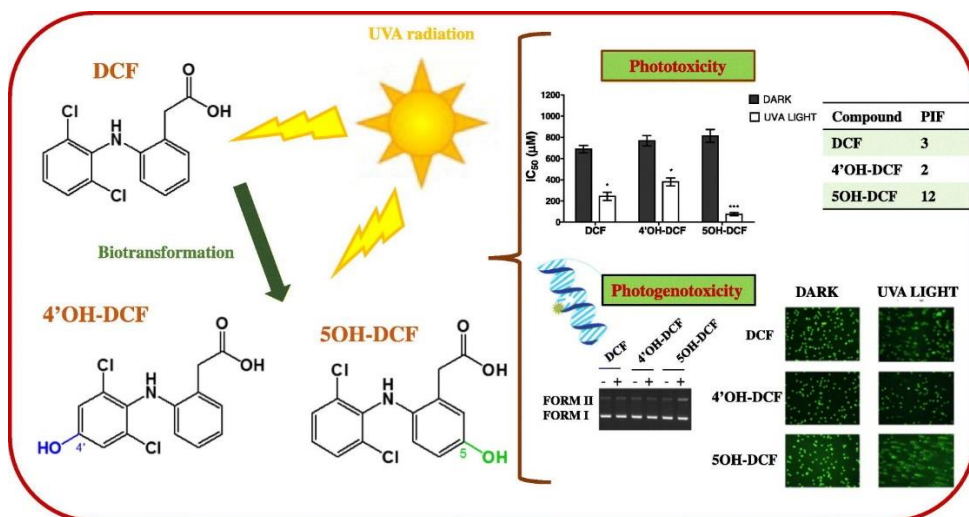
Capítulo 8. Conclusiones

- De los 6 fármacos seleccionados en base a la búsqueda bibliográfica, el ensayo celular de fototoxicidad *in vitro* 3T3 NRU ha identificado al Diclofenaco (DCF), Lapatinib (LAP) y Simeprevir (SIM) como fármacos con propiedades fotosensibilizantes.
- El metabolismo desempeña un papel importante en las reacciones de fotosensibilización. Los principales metabolitos de un fármaco deben considerarse a la hora de evaluar su riesgo fotobiológico. Con respecto al DCF, se ha demostrado que su metabolito 5OH-DCF es fotoactivo y posee mayor foto(geno)toxicidad que el fármaco original. Con relación al LAP, se ha identificado a su metabolito N-LAP con unas propiedades fotogenotóxicas superiores. Finalmente, ambos metabolitos del ansiolítico clorpromazina (CPZ), DMCPZ y DDMCPZ, han presentado una mayor foto(geno)toxicidad y fotomutagenicidad en comparación al propio fármaco.

Sobre el estudio de la foto(geno)toxicidad del DCF y sus metabolitos:

- Los metabolitos hidroxilados del DCF, 4'OH-DCF y 5OH-DCF, presentan un efecto batocrómico en su espectro de absorción UV, que incrementan su fracción activa dentro del espectro de luz solar.
- El metabolito 5OH-DCF posee mayor fototoxicidad en el ensayo *in vitro* 3T3 NRU en comparación con el fármaco original, y también mayor fotogenotoxicidad en el ensayo de electroforesis en gel de agarosa con ADN plasmídico y, a nivel celular, en el ensayo *comet*. Por el contrario, su otro metabolito 4'OH-DCF no posee propiedades fotosensibilizantes.

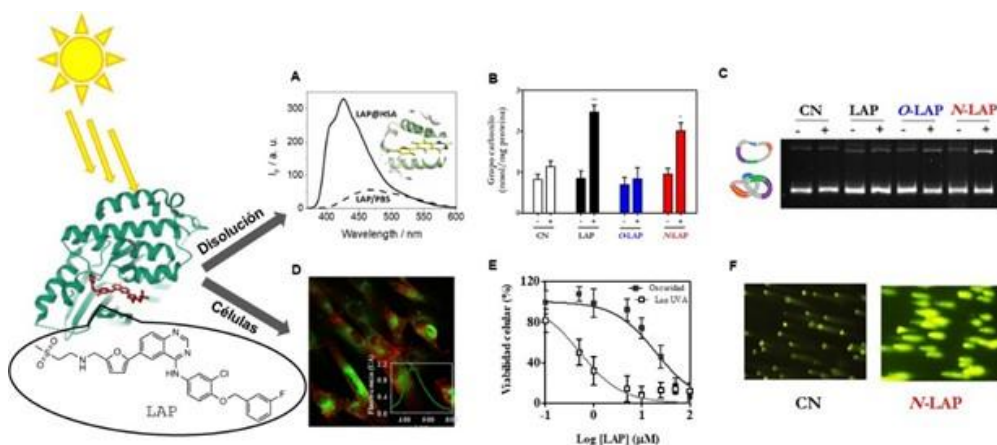
- La maquinaria celular de reparación de daño al ADN es capaz de reparar eficientemente el daño fotoinducido por el DCF, pero no el daño fotoinducido por el 5OH-DCF, lo que podría dar lugar a mutaciones en el genoma de estas células.
- La superior foto(geno)toxicidad del 5OH-DCF no está relacionada sólo con una mayor absorción de luz UV, sino también con una producción más eficiente del fotoproducto clorocarbazol activo.



Sobre el estudio de la foto(geno)toxicidad del LAP y sus metabolitos:

- El LAP y su metabolito *N*-LAP poseen propiedades fototóxicas y fotogenotóxicas según los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* 3T3 NRU y el ensayo *comet*, respectivamente. Sin embargo, su otro metabolito *O*-LAP no es un compuesto fotoactivo.

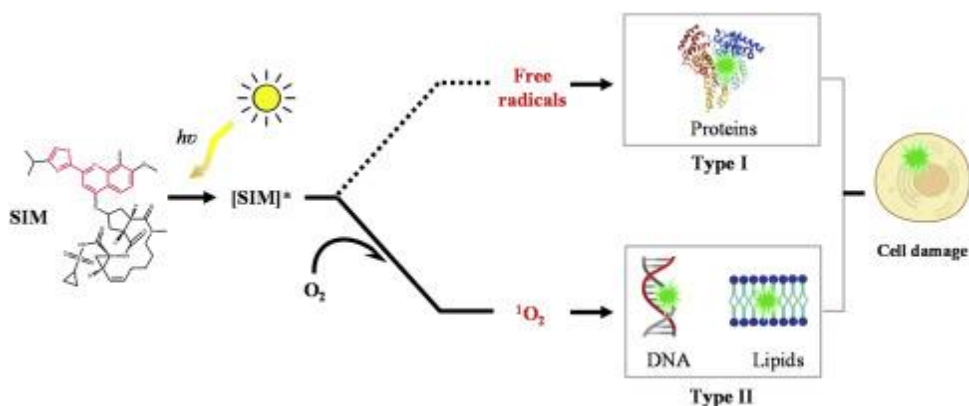
- Con respecto al daño a las biomoléculas, tanto el LAP como el N-LAP producen la oxidación de proteínas y daño en el ADN, por tanto, ambos tienen propiedades fotogenotóxicas.
- El LAP induce una mayor oxidación de proteínas en comparación al N-LAP. Por su parte, el metabolito N-LAP está asociado a una mayor fotogenotoxicidad producida a través de la oxidación de las bases púricas de la molécula de ADN, incluyendo la formación del biomarcador de daño oxidativo 8-oxo-dG.



Sobre el estudio de la foto(geno)toxicidad del SIM:

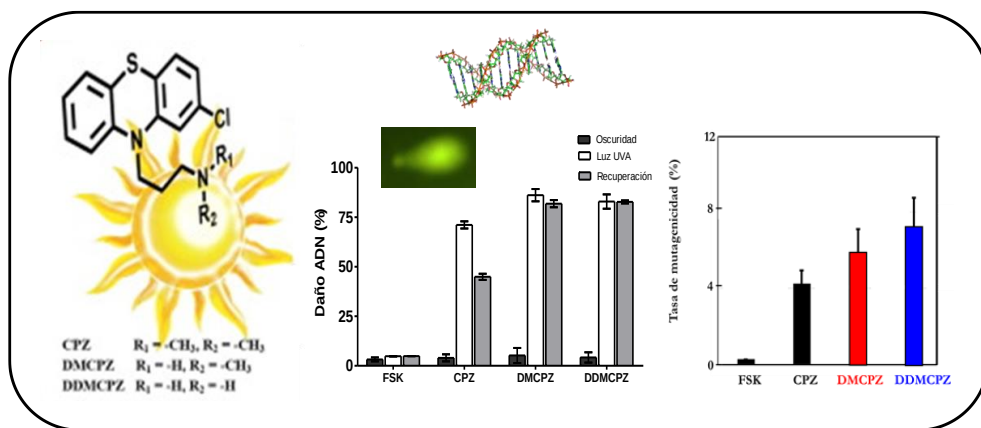
- El fármaco SIM absorbe radiación en la región UVA del espectro electromagnético y tiene propiedades fototóxicas según demuestra el ensayo *in vitro* 3T3 NRU.
- El SIM tiene capacidad para la fotooxidación de lípidos como de proteínas de membrana, como muestran los experimentos con la molécula reportera Bodipy C11 581/591 y la proteína HSA.

- El SIM es un fármaco fotogenotóxico a través de la oxidación de las bases nitrogenadas, como demuestran los ensayos con el plásmido pBR322 en presencia de las enzimas de reparación FPG y Endo III. En el ambiente celular, SIM induce la formación de 8-oxo-dG en el ADN, producto de la oxidación de la base nitrogenada guanina.
- La maquinaria celular de reparación de daño al ADN no es capaz de reparar eficientemente el daño fotoinducido por el SIM, lo que podría dar lugar a mutaciones en el genoma de estas células.
- El estudio fotofísico y de interacción con biomoléculas demuestra que la especie transitoria involucrada en la fototoxicidad del SIM es el estado excitado triplete y la generación de oxígeno singlete. Esta especie reactiva es la responsable del daño a lípidos y al ADN (Mecanismo tipo II). Sin embargo, en presencia de proteínas la formación del estado excitado triplete es menor, generándose menor oxígeno singlete. Estos datos sugieren que la fotooxidación de proteínas por el SIM tiene lugar a través del Mecanismo Tipo I (radicalario).



Sobre el estudio de la fotogenotoxicidad y fotomutagenicidad de la CPZ y sus metabolitos:

- La CPZ genera un daño fotosensibilizado al ADN que es reparado parcialmente por la maquinaria celular de reparación. Sus metabolitos demetilados DMCPZ y DDMCPZ inducen un daño al ADN superior, que es irreversible.
- La secuenciación NGS demuestra que la CPZ y sus metabolitos son fotomutagénicos. Este ensayo muestra la misma tendencia que la observada con el ensayo *comet*, con mayor sensibilidad.
- La secuenciación NGS es una herramienta útil para la determinación de la mutagenicidad inducida por un fármaco fotosensibilizador, alternativa al ensayo *comet* en condiciones alcalinas.



Bibliografia

1. Lucas RM, Yazar S, Young AR, Norval M, de Gruijl FR, Takizawa Y, et al. Human health in relation to exposure to solar ultraviolet radiation under changing stratospheric ozone and climate. *Photochem Photobiol Sci*. 2019;18(3):641-80.
2. Desotelle JA, Wilking MJ, Ahmad N. The circadian control of skin and cutaneous photodamage. *Photochem Photobiol*. 2012;88(5):1037-47.
3. Wortzel JR, Norden JG, Turner BE, Haynor DR, Kent ST, Al-Hamdan MZ, et al. Ambient temperature and solar insolation are associated with decreased prevalence of SSRI-treated psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*. 2019;110:57-63.
4. Esvelt RP, Schnoes HK, DeLuca HF. Vitamin D3 from rat skins irradiated in vitro with ultraviolet light. *Arch Biochem Biophys*. 1978;188(2):282-6.
5. Scragg R, Rahman J, Thornley S. Association of sun and UV exposure with blood pressure and cardiovascular disease: A systematic review. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019;187:68-75.
6. Zhou G, Peng L, Gao W, Zou Y, Tan Y, Ding Y, et al. The acute effects of ultraviolet radiation exposure on solar dermatitis in Shanghai, China. *Int J Biometeorol*. 2020;64(4):585-91.
7. Patra V, Byrne SN, Wolf P. The Skin Microbiome: Is It Affected by UV-induced Immune Suppression? *Front Microbiol*. 2016;7:1235.
8. Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci*. 2017;39(3):241-7.
9. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision

impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(12):e1221-e34.

10. Oakley AM, Badri T, Harris BW. Photosensitivity. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.

11. Olsen CM, Wilson LF, Green AC, Bain CJ, Fritschi L, Neale RE, et al. Cancers in Australia attributable to exposure to solar ultraviolet radiation and prevented by regular sunscreen use. *Aust N Z J Public Health*. 2015;39(5):471-6.

12. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-Garcia C, Rodriguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(4):318-28.

13. Diffey BL, Kochevar IE. Basic Principles of Photobiology. In: Lim HW, Hönigsmann HH, M. HJL, editors. *Photodermatology*. 1st ed: Informa Healthcare USA; 2007.

14. Lui H, Anderson RR. Radiation sources and interaction with skin. In: Lim HW, Hönigsmann HH, M. HJL, editors. *Photodermatology*. 1st ed: Informa Healthcare USA; 2007.

15. Garmyn M, Yarosh DB. The Molecular and Genetic Effects of Ultraviolet Exposure on Skin Cells. In: Lim HW, Hönigsmann HH, M. HJL, editors. *Photodermatology*. 1st ed: Informa Healthcare USA; 2007.

16. Markiewicz E, Idowu OC. DNA damage in human skin and the capacities of natural compounds to modulate the bystander signalling. *Open Biol*. 2019;9(12):190208.

17. Solano F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules*. 2020;25(7).
18. Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C, Verschoore M. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Exp Dermatol*. 2014;23 Suppl 1:7-12.
19. Albin A. Some remarks on the first law of photochemistry. *Photochem Photobiol Sci*. 2016;15(3):319-24.
20. Young AR. Chromophores in human skin. *Phys Med Biol*. 1997;42(5):789-802.
21. Brem R, Guven M, Karran P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:101-9.
22. Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5(2):215-37.
23. Baumler W, Regensburger J, Knak A, Felgentrager A, Maisch T. UVA and endogenous photosensitizers--the detection of singlet oxygen by its luminescence. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(1):107-17.
24. Ferguson J, DeLeo VA. Drug and chemical photosensitivity: exogenous. In: Lim HW, Hönigsmann HH, M. HJL, editors. *Photodermatology*. 1st ed: Informa Healthcare USA; 2007.
25. Lankerani L, Baron ED. Photosensitivity to exogenous agents. *J Cutan Med Surg*. 2004;8(6):424-31.

26. Dijoux N, Guingand Y, Bourgeois C, Durand S, Fromageot C, Combe C, et al. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol In Vitro*. 2006;20(4):480-9.
27. Gould JW, Mercurio MG, Elmetts CA. Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(4):551-73; quiz 74-6.
28. Zgadżaj A, Skrzypczak A, Welenc I, Lugowska A, Parzonko A, Siedlecka E, et al. Evaluation of photodegradation, phototoxicity and photogenotoxicity of ofloxacin in ointments with sunscreens and in solutions. *J Photochem Photobiol B*. 2015;144:76-84.
29. Ravanat JL, Douki T, Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*. 2001;63(1-3):88-102.
30. Pattison DI, Rahmanto AS, Davies MJ. Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(1):38-53.
31. Regensburger J, Knak A, Maisch T, Landthaler M, Baumler W. Fatty acids and vitamins generate singlet oxygen under UVB irradiation. *Exp Dermatol*. 2012;21(2):135-9.
32. Di Mascio P, Martinez GR, Miyamoto S, Ronsein GE, Medeiros MHG, Cadet J. Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins. *Chem Rev*. 2019;119(3):2043-86.
33. Spikes JD. Photosensitization. In: K.C. S, editor. *The Science of Photobiology* Boston, MA: Springer,; 1989. p. 79-110.
34. Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B

radiation requires melanin pigment. *Nature Communications*. 2012;3(1):884.

35. Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Di Mascio P. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2009;8(7):903-11.

36. Neumann NJ, Hanneken S, Ruzicka T, Lehmann P. Phototoxicity of exogenous protoporphyrin IX and delta-aminolevulinic acid in the photo hen's egg test. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2004;20(5):224-9.

37. Yasui Y, Hirone T. Action spectrum for bergamot-oil phototoxicity measured by sunburn cell counting. *J Dermatol*. 1994;21(5):319-22.

38. Tomankova K, Kejlova K, Binder S, Daskova A, Zapletalova J, Bendova H, et al. In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicol In Vitro*. 2011;25(6):1242-50.

39. Nuin E, Gomez-Mendoza M, Andreu I, Marin ML, Miranda MA. New photoactive compounds to probe cholic acid and cholesterol inside mixed micelles. *Org Lett*. 2013;15(2):298-301.

40. Vaya I, Andreu I, Monje VT, Jimenez MC, Miranda MA. Mechanistic Studies on the Photoallergy Mediated by Fenofibric Acid: Photoreactivity with Serum Albumins. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(1):40-6.

41. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*. 1991;54(5):659.

42. Girotti AW, Korytowski W. Cholesterol Peroxidation as a Special Type of Lipid Oxidation in Photodynamic Systems. *Photochem Photobiol*. 2019;95(1):73-82.

43. Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J*. 2007;93(12):4225-36.
44. Beranova L, Cwiklik L, Jurkiewicz P, Hof M, Jungwirth P. Oxidation changes physical properties of phospholipid bilayers: fluorescence spectroscopy and molecular simulations. *Langmuir*. 2010;26(9):6140-4.
45. Bacellar IOL, Baptista MS. Mechanisms of Photosensitized Lipid Oxidation and Membrane Permeabilization. *ACS Omega*. 2019;4(26):21636-46.
46. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;305(3):761-70.
47. Balasubramanian D, Du X, Zigler JS, Jr. The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. *Photochem Photobiol*. 1990;52(4):761-8.
48. Morgan PE, Dean RT, Davies MJ. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen attack. *Eur J Biochem*. 2002;269(7):1916-25.
49. Chiarugi P, Taddei ML, Ramponi G. Oxidation and tyrosine phosphorylation: synergistic or antagonistic cues in protein tyrosine phosphatase. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(9):931-6.
50. Redecke L, Binder S, Elmallah MI, Broadbent R, Tilkorn C, Schulz B, et al. UV-light-induced conversion and aggregation of prion proteins. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(10):1353-61.
51. Nuin E, Perez-Sala D, Lhiaubet-Vallet V, Andreu I, Miranda MA. Photosensitivity to Triflusal: Formation of a Photoadduct with Ubiquitin

Demonstrated by Photophysical and Proteomic Techniques. *Front Pharmacol.* 2016;7:277.

52. Brendler-Schwaab S, Czich A, Epe B, Gocke E, Kaina B, Muller L, et al. Photochemical genotoxicity: principles and test methods. Report of a GUM task force. *Mutat Res.* 2004;566(1):65-91.

53. Reus AA, Usta M, Kenny JD, Clements PJ, Pruimboom-Brees I, Aylott M, et al. The in vivo rat skin photomicronucleus assay: phototoxicity and photogenotoxicity evaluation of six fluoroquinolones. *Mutagenesis.* 2012;27(6):721-9.

54. Kunisada M, Masaki T, Ono R, Morinaga H, Nakano E, Yogiati F, et al. Hydrochlorothiazide enhances UVA-induced DNA damage. *Photochem Photobiol.* 2013;89(3):649-54.

55. Iwamoto T, Hiraku Y, Okuda M, Kawanishi S. Mechanism of UVA-dependent DNA damage induced by an antitumor drug dacarbazine in relation to its photogenotoxicity. *Pharm Res.* 2008;25(3):598-604.

56. Dedon PC. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem Res Toxicol.* 2008;21(1):206-19.

57. Ikehata H, Yamamoto M. Roles of the KEAP1-NRF2 system in mammalian skin exposed to UV radiation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;360:69-77.

58. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.

59. Hohn A, König J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics.* 2013;92:132-59.

60. Viola G, Grobelny P, Linardi MA, Salvador A, Dall'Acqua S, Sobotta L, et al. Pitavastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, induces phototoxicity in human keratinocytes NCTC-2544 through the formation of benzophenanthridine-like photoproducts. *Arch Toxicol.* 2012;86(3):483-96.
61. Vijg J. From DNA damage to mutations: all roads lead to aging. *Ageing Res Rev.* 2021:101316.
62. Krokan HE, Bjoras M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583.
63. Abbotts R, Wilson DM, 3rd. Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic Biol Med.* 2017;107:228-44.
64. Scharer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(10):a012609.
65. Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res.* 2003;531(1-2):37-80.
66. Nakabeppu Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):12543-57.
67. Kabir Y, Seidel R, McKnight B, Moy R. DNA repair enzymes: an important role in skin cancer prevention and reversal of photodamage--a review of the literature. *J Drugs Dermatol.* 2015;14(3):297-303.
68. Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1371-8.

69. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):49-89.
70. Salvador A, Vedaldi D, Brun P, Dall'Acqua S. Vandetanib-induced phototoxicity in human keratinocytes NCTC-2544. *Toxicol In Vitro*. 2014;28(5):803-11.
71. Selvaag E. Clinical drug photosensitivity. A retrospective analysis of reports to the Norwegian Adverse Drug Reactions Committee from the years 1970-1994. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1997;13(1-2):21-3.
72. Stratigos AJ, Antoniou C, Papathanakou E, Daboudi M, Tranaka K, Tsara K, et al. Spectrum of idiopathic photodermatoses in a Mediterranean country. *Int J Dermatol*. 2003;42(6):449-54.
73. Hofmann GA, Gradl G, Schulz M, Haidinger G, Tanew A, Weber B. The frequency of photosensitizing drug dispensings in Austria and Germany: a correlation with their photosensitizing potential based on published literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020;34(3):589-600.
74. Kutlubay Z, Sevim A, Engin B, Tuzun Y. Photodermatoses, including phototoxic and photoallergic reactions (internal and external). *Clin Dermatol*. 2014;32(1):73-9.
75. Monteiro AF, Rato M, Martins C. Drug-induced photosensitivity: Photoallergic and phototoxic reactions. *Clin Dermatol*. 2016;34(5):571-81.
76. Elkeeb D, Elkeeb L, Maibach H. Photosensitivity: a current biological overview. *Cutan Ocul Toxicol*. 2012;31(4):263-72.
77. De Argila D, Aguilera J, Sanchez J, Garcia-Diez A. Study of idiopathic, exogenous photodermatoses. Part 1: pathophysiology and

technical aspects of photobiologic studies. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(2):112-21.

78. Rato M, Gil F, Monteiro AF, Parente J. Fenofibrate photoallergy - relevance of patch and photopatch testing. *Contact Dermatitis.* 2018;78(6):413-4.

79. Doan HQ, Hu MI, Goldstein J, Piha-Paul SA, Subbiah V, Patel AB. Vandetanib photoinduced cutaneous toxicities. *Cutis.* 2019;103(5):E24-E9.

80. Yazici AC, Baz K, Ikizoglu G, Kokturk A, Uzumlu H, Tataroglu C. Celecoxib-induced photoallergic drug eruption. *Int J Dermatol.* 2004;43(6):459-61.

81. Kuwatsuka S, Kuwatsuka Y, Takenaka M, Utani A. Case of photosensitivity caused by fenofibrate after photosensitization to ketoprofen. *J Dermatol.* 2016;43(2):224-5.

82. De Argila D, Aguilera J, Sanchez J, Garcia-Diez A. Study of idiopathic, exogenous photodermatoses, part II: photobiologic testing. *Actas Dermosifiliogr.* 2014;105(3):233-42.

83. Shimizu H. *Diagnosis of skin diseases*, . Shimizu's Dermatology, . 2 ed: Wiley-Blackwell; 2017.

84. Bylaite M, Grigaitiene J, Lapinskaite GS. Photodermatoses: classification, evaluation and management. *Br J Dermatol.* 2009;161 Suppl 3:61-8.

85. Freeman C, Hull C, Sontheimer R, Curtis J. Squamous cell carcinoma of the dorsal hands and feet after repeated exposure to ultraviolet nail lamps. *Dermatol Online J.* 2020;26(3)

.

86. Jew OS, Provini LE, Treat JR. Severe vemurafenib-induced photosensitivity in a 6-year-old boy. *Pediatr Dermatol.* 2019;36(1):e62-e3.
87. Nishisgori C. Current concept of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(9):1713-21.
88. Note for Guidance on Photosafety Testing CPMP/SWP/398/01. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product and Evaluation of Medicines for Human Use. Committee for Proprietary Medicinal Products (EMA/CPMP) 2002.
89. Guidance for Industry, Photosafety Testing. The Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (FDA/CDER). 2002.
90. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD guideline for test of chemicals, 432 In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. 2004.
91. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use, Committee for Proprietary Medicinal Products (EMA/CPMP). Concept paper on the need for revision of the note for guidance on photosafety testing. 2008.
92. S10 Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals Guidance for Industry. In: Administration FaD, editor. 2014.
93. Bauer D, Averett LA, De Smedt A, Kleinman MH, Muster W, Pettersen BA, et al. Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014;68(1):70-5.
94. Onoue S, Igarashi N, Yamada S, Tsuda Y. High-throughput reactive oxygen species (ROS) assay: an enabling technology for screening the

phototoxic potential of pharmaceutical substances. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(1):187-93.

95. Iyama Y, Sato H, Seto Y, Onoue S. Photochemical and Pharmacokinetic Characterization of Orally Administered Chemicals to Evaluate Phototoxic Risk. *J Pharm Sci.* 2019;108(3):1303-8.

96. Moore DE. Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Saf.* 2002;25(5):345-72.

97. Blakely KM, Drucker AM, Rosen CF. Drug-Induced Photosensitivity-An Update: Culprit Drugs, Prevention and Management. *Drug Saf.* 2019;42(7):827-47.

98. Drucker AM, Rosen CF. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, management and prevention. *Drug Saf.* 2011;34(10):821-37.

99. Hofmann GA, Weber B. Drug-induced photosensitivity: culprit drugs, potential mechanisms and clinical consequences. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2021;19(1):19-29.

100. Seto Y, Inoue R, Ochi M, Gandy G, Yamada S, Onoue S. Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones. *AAPS J.* 2011;13(3):482-92.

101. Martinez L, Chignell CF. Photocleavage of DNA by the fluoroquinolone antibacterials. *J Photochem Photobiol B.* 1998;45(1):51-9.

102. de Guidi G, Bracchitta G, Catalfo A. Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences. *Photochem Photobiol.* 2011;87(6):1214-29.

103. Maciel B, Moreira P, Carmo H, Goncalo M, Lobo JMS, Almeida IF. Implementation of an in vitro methodology for phototoxicity evaluation in a human keratinocyte cell line. *Toxicol In Vitro*. 2019;61:104618.
104. Kochevar KE. Phototoxicity mechanisms: chlorpromazine photosensitized damage to DNA and cell membranes. *The Journal of investigative dermatology*. 1981;77(1):59-64.
105. De Mol NJ, Becht AB, Koenen J, Lodder G. Irreversible binding with biological macromolecules and effects in bacterial mutagenicity tests of the radical cation of promethazine and photoactivated promethazine. Comparison with chlorpromazine. *Chem Biol Interact*. 1986;57(1):73-83.
106. Palumbo F, Garcia-Lainez G, Limones-Herrero D, Coloma MD, Escobar J, Jimenez MC, et al. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;313:131-7.
107. Hasan T, Khan AU. Phototoxicity of the tetracyclines: photosensitized emission of singlet delta dioxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(13):4604-6.
108. Lee YS, Yi JS, Lim HR, Kim TS, Ahn IY, Ko K, et al. Phototoxicity Evaluation of Pharmaceutical Substances with a Reactive Oxygen Species Assay Using Ultraviolet A. *Toxicol Res*. 2017;33(1):43-8.
109. Rok J, Wrzesniok D, Beberok A, Otreba M, Delijewski M, Buszman E. Phototoxic effect of oxytetracycline on normal human melanocytes. *Toxicol In Vitro*. 2018;48:26-32.
110. Anaya-Gonzalez C, Soldevila S, Garcia-Lainez G, Bosca F, Andreu I. Chemical tuning for potential antitumor fluoroquinolones. *Free Radic Biol Med*. 2019;141:150-8.

111. Lhiaubet-Vallet V, Bosca F, Miranda MA. Photosensitized DNA damage: the case of fluoroquinolones. *Photochem Photobiol.* 2009;85(4):861-8.
112. Morliere P, Silva AMS, Seixas R, Bosca F, Maziere JC, Ferreira J, et al. Photosensitisation by voriconazole-N-oxide results from a sequence of solvent and pH-dependent photochemical and thermal reactions. *J Photochem Photobiol B.* 2018;187:1-9.
113. Revelle LK, Musser SM, Rowe BJ, Feldman IC. Identification of chlorothiazide and hydrochlorothiazide UV-A photolytic decomposition products. *J Pharm Sci.* 1997;86(5):631-4.
114. Selvaag E, Petersen AB, Gniadecki R, Thorn T, Wulf HC. Phototoxicity to diuretics and antidiabetics in the cultured keratinocyte cell line HaCaT: evaluation by clonogenic assay and single cell gel electrophoresis Comet assay). *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2002;18(2):90-5.
115. Vargas F, Martinez Volkmar I, Sequera J, Mendez H, Rojas J, Fraile G, et al. Photodegradation and phototoxicity studies of furosemide. Involvement of singlet oxygen in the photoinduced hemolysis and lipid peroxidation. *J Photochem Photobiol B.* 1998;42(3):219-25.
116. Mizuma T, McDonagh AF, Lin ET, Benet LZ. Photoinduced covalent binding of frusemide and frusemide glucuronide to human serum albumin. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(1):79-87.
117. Montanaro S, Lhiaubet-Vallet V, Iesce MI, Previtera L, Miranda MA. A mechanistic study on the phototoxicity of atorvastatin: singlet oxygen generation by a phenanthrene-like photoproduct. *Chem Res Toxicol.* 2009;22(1):173-78.

118. Viola G, Grobelny P, Linardi MA, Salvador A, Basso G, Mielcarek J, et al. The phototoxicity of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is mediated by the formation of a benzocarbazole-like photoproduct. *Toxicol Sci.* 2010;118(1):236-50.
119. Nardi G, Lhiaubet-Vallet V, Leandro-Garcia P, Miranda MA. Potential phototoxicity of rosuvastatin mediated by its dihydrophenanthrene-like photoproduct. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(10):1779-85.
120. Vargas F, Canudas N, Miranda MA, Bosca F. Photodegradation and in vitro phototoxicity of fenofibrate, a photosensitizing anti-hyperlipoproteinemic drug. *Photochem Photobiol.* 1993;58(4):471-6.
121. Bosca F, Miranda MA. Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore. *J Photochem Photobiol B.* 1998;43(1):1-26.
122. Lhiaubet V, Paillous N, Chouini-Lalanne N. Comparison of DNA damage photoinduced by ketoprofen, fenofibric acid and benzophenone via electron and energy transfer. *Photochem Photobiol.* 2001;74(5):670-8.
123. Ray RS, Mujtaba SF, Dwivedi A, Yadav N, Verma A, Kushwaha HN, et al. Singlet oxygen mediated DNA damage induced phototoxicity by ketoprofen resulting in mitochondrial depolarization and lysosomal destabilization. *Toxicology.* 2013;314(2-3):229-37.
124. Durbize E, Vigan M, Puzenat E, Girardin P, Adessi B, Desprez PH, et al. Spectrum of cross-photosensitization in 18 consecutive patients with contact photoallergy to ketoprofen: associated photoallergies to non-benzophenone-containing molecules. *Contact Dermatitis.* 2003;48(3):144-9.
125. Hirakawa K, Aoshima M, Hiraku Y, Kawanishi S. Photohydrolysis of methotrexate produces pteridine, which induces poly-G-specific DNA

damage through photoinduced electron transfer. *Photochem Photobiol.* 2002;76(5):467-72.

126. Fernandez RJ, Jorda PA, Fernandez-Navarro JM, Sales AA, Ramiro AN, Miralles AV. [Phototoxicity reaction due to methotrexate]. *An Pediatr (Barc)*. 2012;76(3):179-80.

127. Klaeger S, Gohlke B, Perrin J, Gupta V, Heinzlmeir S, Helm D, et al. Chemical Proteomics Reveals Ferrochelatase as a Common Off-target of Kinase Inhibitors. *ACS Chem Biol.* 2016;11(5):1245-54.

128. Mannerstrom M, Toimela T, Sarkanen JR, Heinonen T. Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017;121 Suppl 3:109-15.

129. Rana S, Fatima N, Yaqoob S, Hameed A, Mirza MR, Jabeen A, et al. Probing photoprotection properties of lipophilic chain conjugated thiourea-aryl group molecules to attenuate ultraviolet-A induced cellular and DNA damages. *Sci Rep.* 2022;12(1):20907.

130. Traynor NJ, Barratt MD, Lovell WW, Ferguson J, Gibbs NK. Comparison of an in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity. *Toxicol In Vitro.* 2000;14(3):275-83.

131. OECD. Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test 2019.

132. Struwe M, Greulich KO, Suter W, Plappert-Helbig U. The photo comet assay--a fast screening assay for the determination of photogenotoxicity in vitro. *Mutat Res.* 2007;632(1-2):44-57.

133. Pap EH, Drummen GP, Winter VJ, Kooij TW, Rijken P, Wirtz KW, et al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). *FEBS Lett.* 1999;453(3):278-82.
134. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186:464-78.
135. Brem R, Macpherson P, Guven M, Karran P. Oxidative stress induced by UVA photoactivation of the tryptophan UVB photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) inhibits nucleotide excision repair in human cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):4310.
136. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. *Clin Liver Dis.* 2017;21(1):1-20.
137. Merk HF. Drug skin metabolites and allergic drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9(4):311-5.
138. Sharma AM, Uetrecht J. Bioactivation of drugs in the skin: relationship to cutaneous adverse drug reactions. *Drug Metab Rev.* 2014;46(1):1-18.
139. Castell J. El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos. 2006.
140. Kato M, Suzuki G, Ohtake H, Seto Y, Onoue S. New Photosafety Assessment Strategy Based on the Photochemical and Pharmacokinetic Properties of Both Parent Chemicals and Metabolites. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(11):1815-22.
141. Kato M, Ohtake H, Sato H, Seto Y, Onoue S. Enzymatic reactive oxygen species assay to evaluate phototoxic risk of metabolites. *Toxicol Lett.* 2017;278:59-65.

142. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125-31.
143. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin.* 2010;26(7):1715-31.
144. Merk HF. Topical diclofenac in the treatment of actinic keratoses. *Int J Dermatol.* 2007;46(1):12-8.
145. Taylor RS, Fotopoulos G, Maibach H. Safety profile of topical diclofenac: a meta-analysis of blinded, randomized, controlled trials in musculoskeletal conditions. *Curr Med Res Opin.* 2011;27(3):605-22.
146. Al-Kathiri L, Al-Asmaili A. Diclofenac-Induced Photo-Onycholysis. *Oman Med J.* 2016;31(1):65-8.
147. Akat PB. Severe photosensitivity reaction induced by topical diclofenac. *Indian J Pharmacol.* 2013;45(4):408-9.
148. Encinas S, Bosca F, Miranda MA. Phototoxicity associated with diclofenac: a photophysical, photochemical, and photobiological study on the drug and its photoproducts. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(8):946-52.
149. Fernandez-Jorge B, Goday-Bujan JJ, Murga M, Molina FP, Perez-Varela L, Fonseca E. Photoallergic contact dermatitis due to diclofenac with cross-reaction to aceclofenac: two case reports. *Contact Dermatitis.* 2009;61(4):236-7.
150. Stierlin H, Faigle JW, Sallmann A, Kung W, Richter WJ, Kriemler HP, et al. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica.* 1979;9(10):601-10.

151. Kenny JR, Maggs JL, Meng X, Sinnott D, Clarke SE, Park BK, et al. Syntheses and characterization of the acyl glucuronide and hydroxy metabolites of diclofenac. *J Med Chem.* 2004;47(11):2816-25.
152. Bort R, Ponsoda X, Jover R, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(1):65-72.
153. Musa KA, Eriksson LA. Photodegradation mechanism of the common non-steroid anti-inflammatory drug diclofenac and its carbazole photoproduct. *Phys Chem Chem Phys.* 2009;11(22):4601-10.
154. Encinas SBFMMA. Photochemistry of 2,6-di-chlorodiphenylamine and 1-chlorocarbazole, the photoactive chromophores of diclofenac, meclofenamic and their mayor photoproducts. *Photochem Photobiol.* 1998;68:640.
155. Loveday KS. Interrelationship of photocarcinogenicity, photomutagenicity and phototoxicity. *Photochem Photobiol.* 1996;63(4):369-72.
156. Moller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milic M, et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nat Protoc.* 2020.
157. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res.* 2006;612(2):84-104.
158. Catala GN, Bestwick CS, Russell WR, Tortora K, Giovannelli L, Moyer MP, et al. Folate, genomic stability and colon cancer: The use of single cell gel electrophoresis in assessing the impact of folate in vitro, in vivo and in human biomonitoring. *Mutat Res.* 2019;843:73-80.

159. Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):949-68.
160. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV. OpenComet: an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014;2:457-65.
161. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen.* 2017;58(5):235-63.
162. Riese DJ, 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays.* 1998;20(1):41-8.
163. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res.* 2014;79:34-74.
164. Kumar R, George B, Campbell MR, Verma N, Paul AM, Melo-Alvim C, et al. HER family in cancer progression: From discovery to 2020 and beyond. *Adv Cancer Res.* 2020;147:109-60.
165. Ledonne A, Mercuri NB. On the Modulatory Roles of Neuregulins/ErbB Signaling on Synaptic Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1).
166. Maennling AE, Tur MK, Niebert M, Klockenbring T, Zeppernick F, Gattenlohner S, et al. Molecular Targeting Therapy against EGFR Family in Breast Cancer: Progress and Future Potentials. *Cancers (Basel).* 2019;11(12).
167. Miller DR, Ingersoll MA, Lin MF. ErbB-2 signaling in advanced prostate cancer progression and potential therapy. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26(4):R195-R209.

168. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000;19(56):6550-65.
169. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(26):2733-43.
170. Kopper L. Lapatinib: a sword with two edges. *Pathol Oncol Res*. 2008;14(1):1-8.
171. Cetin B, Benekli M, Turker I, Koral L, Ulas A, Dane F, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer: a multicentre study of Anatolian Society of Medical Oncology (ASMO). *J Chemother*. 2014;26(5):300-5.
172. Gavila J, De La Haba J, Bermejo B, Rodriguez-Lescure A, Anton A, Ciruelos E, et al. A retrospective, multicenter study of the efficacy of lapatinib plus trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer patients previously treated with trastuzumab, lapatinib, or both: the Trastyvere study. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(3):420-8.
173. Wang H. Lapatinib for the treatment of breast cancer in the People's Republic of China. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1367-73.
174. Schroeder RL, Stevens CL, Sridhar J. Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer. *Molecules*. 2014;19(9):15196-212.
175. Huijberts S, van Geel R, van Brummelen EMJ, Opdam FL, Marchetti S, Steeghs N, et al. Phase I study of lapatinib plus trametinib in patients with KRAS-mutant colorectal, non-small cell lung, and pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2020;85(5):917-30.

176. Towles JK, Clark RN, Wahlin MD, Uttamsingh V, Rettie AE, Jackson KD. Cytochrome P450 3A4 and CYP3A5-Catalyzed Bioactivation of Lapatinib. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(10):1584-97.
177. Castellino S, O'Mara M, Koch K, Borts DJ, Bowers GD, MacLauchlin C. Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: implications for hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(1):139-50.
178. Moon JY, Han JM, Seo I, Gwak HS. Risk factors associated with the incidence and time to onset of lapatinib-induced hepatotoxicity. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;178(1):239-44.
179. Macdonald JB, Macdonald B, Golitz LE, LoRusso P, Sekulic A. Cutaneous adverse effects of targeted therapies: Part I: Inhibitors of the cellular membrane. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72(2):203-18; quiz 19-20.
180. Heppt MV, Clanner-Engelshofen BM, Marsela E, Wessely A, Kammerbauer C, Przybilla B, et al. Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2020;36(2):126-34.
181. Tokura Y, Ogai M, Yagi H, Takigawa M. Afloqualone photosensitivity: immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem Photobiol.* 1994;60(3):262-7.
182. Melhuish WH. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *The Journal of Physical Chemistry.* 1961;65(2):229-35.
183. Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(2):667-74.

184. Kabir MZ, Mukarram AK, Mohamad SB, Alias Z, Tayyab S. Characterization of the binding of an anticancer drug, lapatinib to human serum albumin. *J Photochem Photobiol B*. 2016;160:229-39.
185. Cadet J, Davies KJA. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:2-12.
186. Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int*. 2011;31 Suppl 2:1-3.
187. Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 2016;22(34):7824-40.
188. Raboisson P, de Kock H, Rosenquist A, Nilsson M, Salvador-Oden L, Lin TI, et al. Structure-activity relationship study on a novel series of cyclopentane-containing macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3/4A protease leading to the discovery of TMC435350. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(17):4853-8.
189. Sanford M. Simeprevir: a review of its use in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Drugs*. 2015;75(2):183-96.
190. Flisiak R, Pogorzelska J, Flisiak-Jackiewicz M. Hepatitis C: efficacy and safety in real life. *Liver Int*. 2017;37 Suppl 1:26-32.
191. Marino Z, Pascasio-Acevedo JM, Gallego A, Diago M, Baliellas C, Morillas R, et al. High efficacy of Sofosbuvir plus Simeprevir in a large cohort of Spanish cirrhotic patients infected with genotypes 1 and 4. *Liver Int*. 2017;37(12):1823-32.

192. Lin MV, Chung R. Recent FDA approval of sofosbuvir and simeprevir. Implications for current HCV treatment. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014;3(3):65-8.
193. Hosseini FS, Amanlou M. Anti-HCV and anti-malaria agent, potential candidates to repurpose for coronavirus infection: Virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulation study. *Life Sci*. 2020;258:118205.
194. Trezza A, Iovinelli D, Santucci A, Prischi F, Spiga O. An integrated drug repurposing strategy for the rapid identification of potential SARS-CoV-2 viral inhibitors. *Sci Rep*. 2020;10(1):13866.
195. Bakowski MA, Beutler N, Wolff KC, Kirkpatrick MG, Chen E, Nguyen TH, et al. Drug repurposing screens identify chemical entities for the development of COVID-19 interventions. *Nat Commun*. 2021;12(1):3309.
196. Simpson CL, McCausland D, Chu EY. Photo-distributed lichenoid eruption secondary to direct anti-viral therapy for hepatitis C. *J Cutan Pathol*. 2015;42(10):769-73.
197. Borgia F, Cacciola I, Filomia R, Vaccaro M, Squadrito G, Cannavo SP. Mucocutaneous toxicity during simeprevir treatment for hepatitis C. A single institution, retrospective case series. *Br J Clin Pharmacol*. 2017;83(5):1152-4.
198. Eyre ZW, Secrest AM, Woodcock JL. Photo-induced drug eruption in a patient on combination simeprevir/sofosbuvir for hepatitis C. *JAAD Case Rep*. 2016;2(3):224-6.
199. Manns MP, Fried MW, Zeuzem S, Jacobson IM, Forns X, Poordad F, et al. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic

hepatitis C virus genotype 1 infection: pooled safety analysis from Phase IIb and III studies. *J Viral Hepat.* 2015;22(4):366-75.

200. Vaidya A, Perry CM. Simeprevir: first global approval. *Drugs.* 2013;73(18):2093-106.

201. Boglione L, De Nicolo A, Mornese Pinna S, Cusato J, Favata F, Ariaudo A, et al. Role of simeprevir plasma concentrations in HCV treated patients with dermatological manifestations. *Dig Liver Dis.* 2017;49(6):705-8.

202. Crow LD, Kaizer-Salk KA, Juszczak HM, Arron ST. Medications Associated with Increased Risk of Keratinocyte Carcinoma. *Dermatol Clin.* 2019;37(3):297-305.

203. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res.* 2007;46(5):244-82.

204. Bai J, Zhang Y, Xi Z, Greenberg MM, Zhou C. Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Leads to Substantial DNA-Histone Cross-Links within Nucleosome Core Particles. *Chem Res Toxicol.* 2018;31(12):1364-72.

205. Harth Y, Rapoport M. Photosensitivity associated with antipsychotics, antidepressants and anxiolytics. *Drug Saf.* 1996;14(4):252-9.

206. Epstein JH, Brunsting LA, Petersen MC, Schwarz BE. A study of photosensitivity occurring with chlorpromazine therapy. *J Invest Dermatol.* 1957;28(5):329-38.

207. Epstein S. Chlorpromazine Photosensitivity: Phototoxic and Photoallergic Reactions. *Archives of Dermatology.* 1968;98(4):354-63.

208. Ljunggren B, Möller HJTJoid. Phenothiazine phototoxicity: an experimental study on chlorpromazine and its metabolites. 1977;68 5:313-7.
209. Friedberg EC. A brief history of the DNA repair field. Cell Res. 2008;18(1):3-7.
210. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. Nat Biotechnol. 2008;26(10):1135-45.
211. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet. 2010;11(1):31-46.
212. Schwarz UI, Gulilat M, Kim RB. The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(2).
213. Monnerat C, Chompret A, Kannengiesser C, Avril MF, Janin N, Spatz A, et al. BRCA1, BRCA2, TP53, and CDKN2A germline mutations in patients with breast cancer and cutaneous melanoma. Fam Cancer. 2007;6(4):453-61.
214. Gumaste PV, Penn LA, Cymerman RM, Kirchhoff T, Polsky D, McLellan B. Skin cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers. Br J Dermatol. 2015;172(6):1498-506.

Anexo : Contribuciones científicas

Publicaciones directamente derivadas de la presente tesis

1. García-Lainez G, Martínez-Reig AM, Limones-Herrero D, Consuelo Jiménez M, Miranda MA, Andreu I. Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2018**; *341*: 51-55.
2. Agúndez JAG, García-Martín E, García-Lainez G, Miranda MA, Andreu I. Photomutagenicity of chlorpromazine and its N-demethylated metabolites assessed by NGS. *Sci Rep*. **2020**; *10(1)*:6879.
3. García-Lainez G, Vayá I, Marín MP, Miranda MA, Andreu I. In vitro assessment of the photo(geno)toxicity associated with Lapatinib, a Tyrosine Kinase inhibitor. *Arch Toxicol*. **2021**; *95(1)*: 169-178.
4. García-Lainez G, El Ouardi M, Moreno A, Lence E, González-Bello C, Miranda MA, Andreu I. Singlet oxygen and radical-mediated mechanisms in the oxidative cellular damage photosensitized by the protease inhibitor simeprevir. *Free Radic Biol Med*. **2023**; *194*: 42-51.

Otras publicaciones relacionadas

5. Molins-Molina O, BresolíOBach, R, García-Lainez G, Andreu I, Nonell S, Miranda MA, Jiménez MC. Singlet oxygen production and in vitro phototoxicity studies on fenofibrate, mycophenolate mofetil, trifusal, and their active metabolites. *J Phys Org Chem*. **2017**; *30*: e3722.

6. Aparici-Espert I, Garcia-Lainez G, Andreu I, Miranda MA, Lhiaubet-Vallet V. Oxidatively Generated Lesions as Internal Photosensitizers for Pyrimidine Dimerization in DNA. *ACS Chem Biol*. **2018**;13(3): 542-547
7. Anaya-Gonzalez C, Soldevila S, Garcia-Lainez G, Bosca F, Andreu I. Chemical tuning for potential antitumor fluoroquinolones. *Free Radic Biol Med*. 2019 ; 141:150-158.

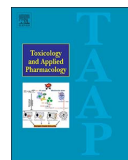
Comunicaciones en Congresos

Andreu I, García-Lainez G, Miranda MA. Photo(geno)toxicity induced by reactive drug metabolites. 15th Euro-Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology. Berlin Julio 2018

Contribución: Comunicación Oral.

García-Lainez G, Moreno A, Miranda MA, Andreu I. Oxidative DNA damage contributes to phototoxicity of the Hepatitis C Virus Protease Inhibitor Simeprevir. 3rd Workshop on DNA damage and Repair. Chemistry, Biology and Medicine. Valencia Septiembre 2019.

Contribución: Comunicación Oral.



High impact short article

Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism

Guillermo Garcia-Lainez^a, Ana M. Martínez-Reig^a, Daniel Limones-Herrero^b,
M. Consuelo Jiménez^b, Miguel A. Miranda^{b,*}, Inmaculada Andreu^{a,b,*}^a Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain^b Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Departamento de Química, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Comet assay
DNA repair capability
Metabolites
Photosensitized DNA damage
Phototoxicity

ABSTRACT

Diclofenac (DCF) can cause adverse reactions such as gastrointestinal, renal and cardiovascular disorders; therefore, topical administration may be an attractive alternative to the management of local pain in order to avoid these side effects. However, previous studies have shown that DCF, in combination with sunlight, displays capability to induce photosensitivity disorders. In humans, DCF is biotransformed into hydroxylated metabolites at positions 4' and 5 (4'OH-DCF and 5OH-DCF), and this chemical change produces non negligible alterations of the drug chromophore, resulting in a significant modification of its light-absorbing properties. In the present work, 5OH-DCF exhibited higher photo(geno)toxic potential than the parent drug, as shown by several *in vitro* assays (3T3 NRU phototoxicity, DNA ssb gel electrophoresis and COMET), whereas 4'OH-DCF did not display significant photo(geno)toxicity. This could be associated, at least partially with their more efficient UV-light absorption by 5OH-DCF metabolite and with a higher photoreactivity. Interestingly, most of the cellular DNA damage photosensitized by DCF and 5OH-DCF was repaired by the cells after several hours, although this effect was not complete in the case of 5OH-DCF.

1. Introduction

Diclofenac (2-(2,6-dichlorophenylamino)phenylacetic acid, DCF) is a widely prescribed nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID), which can be administered either topically or orally. It is therapeutically used in the treatment of several rheumatic diseases and as an analgesic. As DCF can cause severe adverse reactions such as gastrointestinal, renal and cardiovascular disorders, topical administration may be an attractive alternative to the management of local pain in order to avoid these side effects (Merk, 2007; Taylor et al., 2011). However, previous studies have shown that DCF, in combination with sunlight, displays capability to induce photosensitivity reactions (Encinas et al., 1998a; Lhiaubet-Vallet and Miranda, 2012; Akat, 2013; Fernandez-Jorge et al., 2009; Al-Kathiri and Al-Asmaili, 2016; Kowalick and Ziegler, 2006).

In this context, taking into account that metabolites can generate, upon irradiation, reactive intermediates capable of binding to key biomacromolecules such as DNA, identification of metabolites with

phototoxic or adduct forming capability still remains a major challenge. Therefore, although biotransformation is normally associated with a decreased toxicity, metabolites may be more phototoxic and photo-reactive than the parent drug (Kato et al., 2017; Pearson and Wienkers, 2009; Miranda, 1997).

Thus, in a previous work we have proven that demethylation of chlorpromazine (CPZ) as a consequence of Phase I biotransformation, does not result in a detoxification but leads to metabolites maintaining identical chromophore to the parent drug and exhibiting an even enhanced phototoxicity (Palumbo et al., 2016).

In humans, DCF is biotransformed by glucuronosyl-transferase UGT2B7 to its acyl glucuronide and/or via oxidation of the aromatic rings by cytochrome P450 enzymes (CYPs) into hydroxylated metabolites (Kenny et al., 2004; Stierlin et al., 1979). In this context, major metabolic pathways are hydroxylations in positions 4' or 5 (4'OH-DCF and 5OH-DCF, see Fig. 1A), and to a much lesser extent, in position 3 (Stierlin et al., 1979).

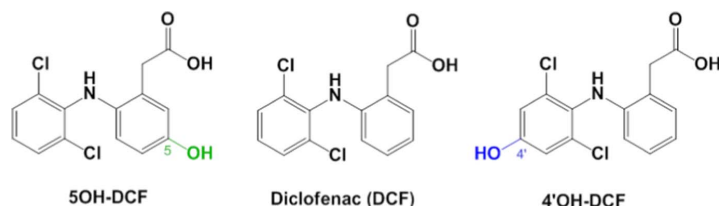
Unlike the case of CPZ demethylation, the 4'OH-DCF and 5OH-DCF

Abbreviations: DCF, diclofenac; 5OH-DCF, 5-hydroxy-diclofenac; 4'OH-DCF, 4'-hydroxy-diclofenac; CPZ, chlorpromazine; SDS, sodium dodecyl sulphate; NSAID, nonsteroidal antiinflammatory drug; HSA, Human Serum Albumin; CYPs, cytochrome P450 enzymes; ssb, single strand break; Fpg, *E. coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase; Endo III, *E. coli* endonuclease III; EndoV, T4 endonuclease V; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate buffered saline; FSK, fibroblasts; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; TAE, tris-acetate-EDTA; NRU, neutral red uptake; PIF, photo-irritation factor

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mmiranda@qim.upv.es (M.A. Miranda), iandreur@qim.upv.es (I. Andreu).

A)



B)

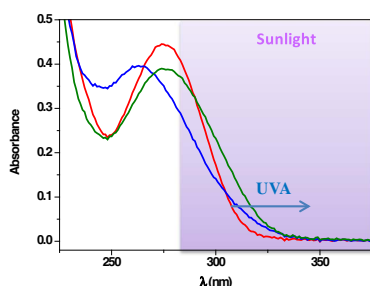


Table 1
Phototoxicity of DCF and its metabolites in the 3T3 NRU Assay.

Compound	IC ₅₀ dark (μM)	IC ₅₀ UVA light (μM)	Photoirritant factor (PIF) ^a
CPZ	84 ± 18	4 ± 1	21
DCF	688 ± 63	254 ± 58	3
4'OH-DICF	766 ± 85	375 ± 55	2
5OH-DICF	813 ± 106	68 ± 27	12
SDS	202 ± 25	244 ± 48	1

Data are the mean ± SD of five independent experiments performed in triplicate. CPZ and SDS were used as positive and negative controls of phototoxicity respectively.

^a According to the OECD 432 Guide (2004), PIF < 2 predicts “no phototoxicity”, 2 < PIF < 5 predicts “probable phototoxicity” and PIF > 5 predicts “phototoxicity”.

metabolites are associated with a change in the chromophore. Moreover, as shown in Fig. 1B both metabolites 4'OH-DICF and 5OH-DICF display a bathochromic shift of the absorption band towards the UVA region, thus extending the active fraction of solar light able to produce photosensitivity disorders. With this background, the goal of the present work is to assess the photo(geno)toxic potential of DCF metabolites in order to investigate whether DCF biotransformation modulates the potential to photosensitize DNA damage.

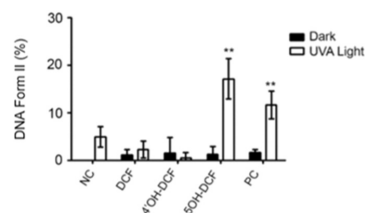
2. Materials and methods

2.1. General chemicals and reagents

All solvents were commercially available (HPLC grade) and were used without any further purification. Diclofenac sodium salt (DCF), 4'-hydroxydiclofenac (4'OH-DICF), 5-hydroxydiclofenac (5OH-DICF) chlorpromazine (CPZ), sodium dodecyl sulphate (SDS), neutral red solution and DNA repair enzymes *E. coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg), *E. coli* endonuclease III (Endo III), linoleic acid and

Fig. 1. A) Chemical structures of diclofenac (DCF) and its metabolites 4'OH-DICF and 5OH-DICF. B) Ultraviolet spectra of DCF (red), 4'OH-DICF (blue) and 5OH-DICF (green). Concentrations of DCF and its metabolites were 4×10^{-5} M in PBS. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

A)



B)

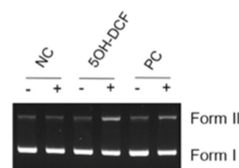


Fig. 2. A) Induction of single strand breaks (ssb) in supercoiled circular pBR322 plasmid (200 ng/μL) alone (negative control, NC) or treated with DCF and its metabolites at 100 μM upon 30 min UVA irradiation (□) or not (■) using a multilamp photoreactor $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm. DNA Form II was quantified by densitometry of agarose gel electrophoresis. Data represent the mean ± SD of four independent experiments and asterisks indicate significant differences relative to the formation of DNA Form II in dark conditions by the T-Student test (**p < 0.01). B) Agarose gel electrophoresis of plasmid pBR322 alone (NC) or in the presence of 5OH-DICF, in the dark (–) or upon 5 min UVA irradiation (+). Ketoprofen was used as positive control (PC).

human serum albumin (HSA) were provided by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). For the preliminary experiments, 5-hydroxydiclofenac (5OH-DICF) was synthesized by standard procedures (Othman et al., 2000).

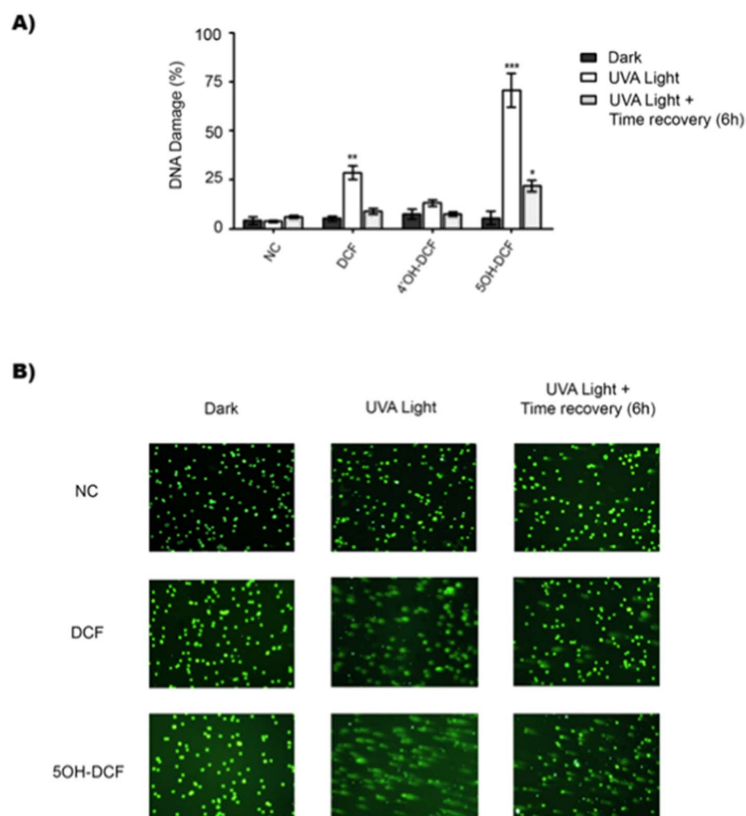


Fig. 3. Alkaline comet assay and DNA repair capability of FSK cells treated with DCF and its metabolites. **A)** Percentage of DNA damage calculated by OpenComet software of untreated FSK cells (Negative control, NC) or treated with DCF and its metabolites (100 μ M). Cells were left unexposed (Dark, ■), irradiated for 5 min (UVA Light, □) or irradiated for 5 min followed by 6 h of cell recovery (UVA Light + Time recovery 6 h, ▨), respectively. Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the untreated FSK cells in dark conditions by the *t*-Student test (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). **B)** Fluorescence microscopy images of DCF and 5OH-DCF Comet assay experiments.

Supercoiled plasmid pBR322, DNA repair enzyme T4 endonuclease V (EndoV) and SYBR Safe DNA gel stain were purchased from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), Ecogen (Barcelona, Spain) and Invitrogen (Madrid, Spain), respectively. For cell culture experiments, fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and penicillin-streptomycin were supplied by Invitrogen (Madrid, Spain) and trypsin-EDTA (0.25%–0.02%) and glutamine (100 mM) solutions were provided by Cultek (Madrid, Spain). Phosphate buffered saline solution (PBS, pH 7.4, 0.01 M) was prepared by dissolving Sigma tablets in the appropriate volume of ultrapure deionized water. Reagent kit for single cell electrophoresis assay was supplied by Trevigen (Barcelona, Spain).

2.2. Irradiation equipment

The UV light source used in all *in vitro* photosensitization assays was a photoreactor model LZC-4 (Luzchem, Canada) equipped with 14 lamps for top and side irradiation (λ_{max} = 350 nm, Gaussian distribution). All irradiations were carried out through the lid of the plates (96 well-plates and 6 well-plates for phototoxicity and photogenotoxicity experiments, respectively), and in order to avoid overheating ventilation was used and the plates were placed on ice during the irradiation step.

2.3. Absorption and emission spectral measurements

Ultraviolet absorption spectra were recorded on a Shimadzu UV-1800 UV/VIS spectrophotometer. Measurements were performed in

PBS (4×10^{-5} M) at room temperature using 1 cm quartz cells with 3.5 mL capacity.

For fluorescence experiments 100 μ M of DCF, 4'OH-DCF and 5OH-DCF in PBS were incubated for 2 h in 96 black well plates in the presence of linoleic acid (1 mM), HSA (100 μ M) and whole cells (8.000 cells/well). Next, the samples were irradiated and the fluorescence emissions (λ_{exc} = 320 nm and λ_{em} = 390 nm) were recorded using a Synergy H1 multi-mode microplate reader (Biotek, Vermont, USA).

2.4. DNA damage induced by photosensitization

Mixtures containing 200 ng of supercoiled circular plasmid pBR322 and DCF (100 μ M) or its metabolites (100 μ M) were irradiated as described above. Digestion with an excess of the repair enzymes (Fpg, Endo III or Endo V) was performed immediately after UVA irradiation in order to reveal the nature of DNA damages. Upon irradiation/digestion, loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in water) was added to each sample. All the samples were loaded on a 0.8% agarose gel containing SYBR® Safe as dye of nucleic acid. Electrophoresis was carried out in Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (0.004 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) at 100 V for 1 h. Next, the DNA bands were detected under UV light irradiation and visualized using a Gel Logic 200 Imaging System (Kodak). Finally, the relative abundance of supercoiled DNA (Form I) and nicked relaxed DNA (Form II) was quantified by densitometry with the image analyzer Quantity One (Biorad).

2.5. Assessment of cellular photo(geno)toxicity

2.5.1. *In vitro* 3T3 neutral red uptake (NRU) phototoxicity test

BALB/c 3T3 fibroblast cell line was grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 4 mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin and routinely maintained in 75 cm² plastic flasks in a humidified incubator at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. The 3T3 NRU phototoxicity test was performed according to the OECD guideline 432 (OECD, 2004) with minor modifications such as cell density (2.5×10^4 cells/well vs 1.0×10^4 cells/well) or the volume of the desorption solution (100 µL/well vs 150 µL/well). For each compound two 96-wells plates were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/well. Serial dilutions of the test compounds ranging from 4 mM to 0.05 mM were added to each plate. After a period of 1 h incubation, one plate was irradiated with a dose of UVA equivalent to 5 J/cm² (UVA light), whereas the other plate was kept in a dark box (dark). The viability of UVA-treated control cells in the absence of test compounds was > 90% of those kept in the dark indicating the suitability of the UV dose. At the end of the UVA exposure plates were replaced with DMEM medium and then incubated overnight. Next day neutral red solution (50 µg/mL) was added into each well and incubated for 2 h. After that, neutral red medium was discarded, cells were washed with PBS and neutral red extraction was achieved with 100 µL of the desorption solution (water 49% (v/v), ethanol 50% (v/v) and acetic acid 1% (v/v)). The absorbance was recorded at 550 nm on a Multiskan Ex microplate reader. For each compound dose-response curves were developed, which allowed the determination of IC₅₀ values (concentration of compound causing a 50% reduction of the neutral red uptake) in the absence and in the presence of radiation. Finally, the Photo-Irritation-Factor (PIF) was calculated with the following equation: $PIF = \frac{IC_{50\text{ DARK}}}{IC_{50\text{ UVA LIGHT}}}$. According to the OECD Guideline (OECD, 2004) a test compound is labeled as “phototoxic” if PIF is > 5, “probably phototoxic” if PIF > 2 and < 5, and “non-phototoxic” when PIF < 2. CPZ and SDS were used as positive and negative controls, respectively.

2.5.2. Nuclear DNA damage by COMET assay

The single cell gel electrophoresis assay, also known as comet assay, was performed as previously described (Palumbo et al., 2016) with slight modifications such as the kind of slides (Trevigen® treated slides vs agarose pre-coated slides), the size of the agarose drops (100 µL vs 5 µL) and the DNA percentage in tail quantification method (automated quantification, Open Comet Software, vs manual visual quantification). Human fibroblasts (FSK cell line) were trypsinized, resuspended in cold PBS and placed on ice for 2 h. Cells (100,000 cells/well in two 12-well plates) were seeded and treated with 100 µM of DCF or its metabolites. CPZ (10 µM) was used as a positive control. After 1 h incubation, one plate was placed in the photoreactor in order to irradiate the cells for 5 min on ice, whereas the other one was kept in a dark box. Next, 100 µL of each cell suspension were mixed carefully with 100 µL of 1% low melting point agarose solution and drops were loaded onto Trevigen® treated slides and placed on ice-cold tray to allow its jellyfication. Then the slides were immersed in coupling jars containing cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100 in distilled water and pH 10) and overnight incubated at 4 °C. In DNA-recovery assays, after drop jellyfication, the slides were incubated in DMEM medium at 37 °C for different time periods (3 h, 6 h or 18 h) and then subjected to cell lysis. Next day all slides were placed in a Trevigen® Comet assay electrophoresis tank (10 slides per run), covered with 850 mL of cold alkaline electrophoresis buffer (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA in distilled water and pH ≥ 13) and let during 40 min for DNA unwinding at 4 °C. Afterwards, the electrophoresis was run at 21 V (≈ 300 mA) for 30 min at 4 °C. When the electrophoresis finished, the slides were neutralized twice in PBS for 5 min and washed once with milliQ water for 5 min; DNA was fixed by slide incubation in 70% ethanol for 5 min followed by other 5 min in 100% ethanol, and then

air-dried. Finally, comet nucleoids and tails were stained by incubating the slides in a SYBR Gold® (1:10,000 TE buffer) bath for 30 min, air dried, and kept in darkness until further visualization. For nucleoids and tails DNA visualization a Leica DMI 4000B fluorescence microscope was used and ≥ 5 pictures were taken for each sample. Finally, DNA % in tail as a measure of DNA damage was determined for each condition with the analysis of at least 100 DNA comets with the open source analysis software Open Comet 1.3 (Gyori et al., 2014).

3. Results and discussion

3.1. Phototoxicity

In vitro 3T3 NRU phototoxicity assay was performed in order to assess the cell viability upon exposure to DCF and its metabolites in combination with UVA irradiation (5 J/cm²). Accordingly, cytotoxicity profiles of BALB/c 3T3 fibroblasts treated with DCF, 4’OH-DCF and 5OH-DCF were measured, using neutral red as vital dye, both in dark and in the presence of UVA light. Thus, the IC₅₀ values were determined from dose-response curves for cell viability of cells treated under the conditions described above in the materials and methods section (dose-response curves are provided in Supplementary material, S2).

The aim of NRU test is to calculate the PIF that corresponds to the ratio of the IC₅₀ under dark or light conditions for each compound. As shown in Table 1, 5OH-DCF metabolite resulted to be potentially phototoxic with a PIF value ca. 12.4 fold more phototoxic than the parent drug. Both DCF and 4’OH-DCF displayed a PIF of 3 and 2, respectively, which can be considered as probable phototoxicity. Table 1 collects the IC₅₀ under dark and UVA light conditions as well as the PIF of all compounds tested.

It is known that the photosensitizing properties of DCF are associated with the main photoproduct, which corresponds to a fluorescent chlorocarbazole derivative, as revealed in photohemolysis and lipid photoperoxidation assays (Encinas et al., 1998a). Thus, the key process is the photodechlorination, triggered by homolytic carbon-chlorine bond cleavage with generation of a highly reactive aryl radical and choride anion (Encinas et al., 1998b). To check whether this reaction occurs not only in the parent drug but also in the metabolites under study, the relative photoreactivity was investigated by comparing the fluorescence changes upon UVA-irradiation. The results obtained for DCF, 4’OH-DCF and 5OH-DCF in PBS and in the presence of lipids, proteins or whole cells are illustrated in the supplementary material (S3). In all cases, 5OH-DCF exhibited the most remarkable emission enhancement, pointing to a higher photoreactivity. Thus, the higher phototoxicity of 5OH-DCF is not only associated with its more efficient UV-light absorption, but also with its more efficient production of the active chlorocarbazole upon irradiation.

3.2. Photogenotoxicity of DCF and its metabolites

Irradiations of DCF, 4’OH-DCF and 5OH-DCF in the presence of supercoiled circular DNA (pBR322) were performed using a multilamp photoreactor (λ_{max} = 355 nm) in order to detect DNA damage. Quantification by densitometry of the conversion of native supercoiled form I into circular form II (Fig. 2A) shown in agarose gel (Fig. 2B) evidenced single strand break (ssb) formation. It is interesting to note that 5OH-DCF exhibited higher photogenotoxic potential than the parent drug whereas 4’OH-DCF did not display significant photogenotoxicity (Fig. 2).

Moreover, in order to reveal the nature of damages induced on the DNA bases, different DNA-repair enzymes were used: i) T4 endonuclease V (Endo V) for cyclobutane thymine dimers (CPDs), ii) endonuclease III (Endo III) for degradation products of pyrimidine bases and iii) formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) for oxidized purines. Thus, ssb formation was enhanced for 5OH-DCF metabolite (data reported in Supplementary material, S4) in all cases.

Assessment of cellular photogenotoxicity was performed by Comet assay under alkaline conditions to reveal the combined nuclear DNA damage resulting from single-strand breaks, double-strand breaks and alkali-labile sites. For this purpose, human fibroblasts (FSK) were embedded in agarose on a slide and incubated for 1 h with DCF and its hydroxylated metabolites. Next, alkaline electrophoresis was carried out after 5 min of UVA exposure (2 J/cm^2) and subsequent lysis. In the course of electrophoresis, the damaged and fragmented DNA migrates away from the nucleus and upon staining with SYBR Gold the fluorescence of the nuclei was observed. Percentage of DNA damage was calculated by means of OpenComet software.

As shown in Fig. 3, 5OH-DCF showed again higher photogenotoxicity than the parent drug DCF and 4'OH-DCF metabolite (see Supplementary material, S5). Moreover, another set of experiments were performed in order to investigate the ability of FSK cells to repair nuclear DNA damage generated by DCF and metabolites in combination with UVA light. For this purpose, FSK cells treated (with drug and metabolites) and irradiated were incubated for different time periods (3 h, 6 h and 18 h) and the remaining DNA damage was calculated as described above. As a general trend DNA damage decreased with the time of recovery. Interestingly, for DCF it was shown that most DNA damage was repaired within 3 h after irradiation whereas for 5OH-DCF a significant residual DNA damage (around 25%) was still present even after 18 h of cell recovery (Fig. 3 and Supplementary material, Fig. S6).

4. Conclusion

Hydroxylation of the aromatic rings at positions 4' and 5 occurs during phase I biotransformation of DCF. This chemical change produces non negligible alterations of the drug chromophore and results in a significant modification of its light-absorbing properties and its photochemical reactivity. Accordingly, the phototoxic and photogenotoxic potential of DCF, 4'OH-DCF and 5OH-DCF are expectedly different, as indicated by 3T3 NRU phototoxicity assay, the DNA single strand break gel electrophoresis assay and the COMET assay. The most remarkable result is the enhanced photo(geno)toxicity of 5OH-DCF, which was consistently observed in all experiments. Interestingly, most of the cellular DNA damage photosensitized by DCF and 5OH-DCF was repaired by the cells after several hours, although this effect was not complete in the case of 5OH-DCF.

Funding

This work was supported by the Carlos III Institute of Health (Grants: RD16/0006/0030, PI16/01877), by the MINECO (Grants: CTQ2013-47872, CTQ2016-78875), and by the Generalitat Valenciana (Prometeo 2017/075).

Acknowledgements

We would like to thank M. Dolores Coloma for technical assistance in the preliminary experiments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.005>.

References

- Akat, P.B., 2013. Severe photosensitivity reaction induced by topical diclofenac. *Indian J. Pharm.* 45, 408.
- Al-Kathiri, L., Al-Asmaili, A., 2016. Diclofenac-induced photo-onycholysis. *Oman Med. J.* 31, 65.
- Encinas, S., Bosca, F., Miranda, M.A., 1998a. Phototoxicity associated with diclofenac: a photophysical, photochemical, and photobiological study on the drug and its photoproducts. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 946.
- Encinas, S., Bosca, F., Miranda, M.A., 1998b. Photochemistry of 2,6-dichlorodiphenylamine and 1-chlorocarbazole, the photoactive chromophores of diclofenac, meclofenamic acid and their major photoproducts. *Photochem. Photobiol.* 68, 640.
- Fernandez-Jorge, B., Goday-Bujan, J.J., Murga, M., Piñeyro Molina, F., Perez-Varela, L., Fonseca, E., 2009. Photoallergic contact dermatitis due to diclofenac with cross-reaction to aceclofenac: two case reports. *Contact Derm.* 61, 236.
- Gyori, B.M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P.S., Hsu, D., Clement, M., 2014. OpenComet : an automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2, 457.
- Kato, M., Ohtake, H., Sato, H., Seto, Y., Onoue, S., 2017. Enzymatic reactive oxygen species assay to evaluate phototoxic risk of metabolites. *Toxicol. Lett.* 278, 59.
- Kenny, J.R., Maggs, J.L., Meng, X., Sinnott, D., Clarke, S.E., Park, B.K., Stachulski, A.V., 2004. Syntheses and characterization of the acyl glucuronide and hydroxy metabolites of diclofenac. *J. Med. Chem.* 47, 2816.
- Kowalzik, L., Ziegler, H., 2006. Photoallergic contact dermatitis from topical diclofenac in Solaraze gel. *Contact Derm.* 54, 348.
- Lhiaubet-Vallet, V., Miranda, M.A., 2012. Photosensitization by drugs. In: *CRC Handbook Organic Photochemistry Photobiology*, pp. 1541.
- Merk, H.F., 2007. Topical diclofenac in the treatment of actinic keratoses. *Int. J. Dermatol.* 46 (21).
- Miranda, M.A., 1997. Phototoxicity of drugs. In: Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J. (Eds.), *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*. Academic Press, San Diego, pp. 289–315.
- OECD, 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. (Original Guideline, adopted 13th April 2004).
- Othman, S., Mansuy-Mouries, V., Bensoussan, C., Battioni, P., Mansuy, D.C.R., 2000. *Acad. Sci. Paris, Série IIC, Chimie/Chemistry* 3, 751.
- Palumbo, F., García-Lainez, G., Limones-Herrero, D., Coloma, M.D., Escobar, J., Jiménez, M.C., Miranda, M.A., Andreu, I., 2016. Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 313, 131.
- Pearson, P.G., Wienkers, L.C., 2009. *Handbook of Drug Metabolism*, 2nd Ed. .
- Stierlin, H., Faigle, J.W., Sallmann, A., Kung, W., Richter, W.J., Kriemler, H.P., Alt, K.O., Winkler, T., 1979. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica* 9, 601.
- Taylor, R.S., Fotopoulos, G., Maibach, H., 2011. Safety profile of topical diclofenac: a meta-analysis of blinded, randomized, controlled trials in musculoskeletal conditions. *Curr. Med. Res. Opin.* 27, 605.



OPEN

Photomutagenicity of chlorpromazine and its *N*-demethylated metabolites assessed by NGS

José A. G. Agúndez¹, Elena García-Martín¹, Guillermo García-Lainez², Miguel A. Miranda^{3,4}✉ & Inmaculada Andreu^{3,4}✉

The human genome is constantly attacked by endogenous and exogenous agents (ultraviolet light, xenobiotics, reactive oxygen species), which can induce chemical transformations leading to DNA lesions. To combat DNA damage, cells have developed several repair mechanisms; however, if the repair is defective, DNA lesions lead to permanent mutations. Single-cell gel electrophoresis (COMET assay) is a sensitive and well-established technique for quantifying DNA damage in individual cells. Nevertheless, this tool lacks relationship with mutagenesis. Therefore, to identify errors that give rise to mutations it would be convenient to test an alternative known procedure, such as next generation sequencing (NGS). Thus, the present work aims to evaluate the photomutagenicity of neuroleptic drug chlorpromazine (CPZ), and its *N*-demethylated metabolites using COMET assay and to test NGS as an alternative method to assess photomutagenesis. In this context, upon exposure to UVA radiation, COMET assay reveals CPZ-photosensitized DNA damage partially repaired by cells. Conversely with this result, metabolites demethylchlorpromazine (DMCPZ) and didemethylchlorpromazine (DDMCPZ) promote extensive DNA-photodamage, hardly repaired under the same conditions. Parallel assessment of mutagenesis by NGS is consistent with these results with minor discrepancies for DDMCPZ. To our knowledge, this is the first example demonstrating the utility of NGS for evaluating drug-induced photomutagenicity.

The human genome is exposed to continuous attack by endogenous and exogenous genotoxic stresses (ultraviolet light, ionizing radiation, xenobiotics, reactive oxygen species, etc). These agents can induce chemical transformations leading to the most common DNA lesions: base and sugar modifications, alkylation, single strand breaks (ssb) generated by oxidation, and spontaneous hydrolysis. In this context, cells have developed several DNA-repair pathways; however, if damaged DNA is not properly repaired, DNA lesions may lead to permanent mutations in the genetic code as a consequence of the change in the sequence of base pairs^{1–7}. For detecting genotoxicity in single cells, a very versatile, sensitive and well-established technique is the single-cell gel electrophoresis or COMET assay^{8–11}. This tool is based on an electrophoresis with DNA of lysed, agarose-embedded cells, also known as nucleoids, which upon fluorescent staining appear a comet-like image. Thus, the comet head is composed of intact DNA, while the tail consists of single-strand or double-strand DNA breaks. The relative amount of DNA migrating away from the head of the comet is directly proportional to the extent of DNA damage. However, this data indicates DNA alterations but it does not necessarily relate to mutagenesis. Thus, the lack of a close relationship between DNA migration in the COMET assay and mutagenesis may be explained because the former detects unrepaired DNA, while in the latter only the misrepaired errors are considered. Therefore, in order to identify errors that might give rise to mutations it would be convenient to test the potential of an alternative known platform such as next generation sequencing (NGS) or high-throughput sequencing^{12–15}. These techniques

¹University Institute of Molecular Pathology Biomarkers, UEX. ARADyAL, Instituto de Salud Carlos III, 10003, Cáceres, Spain. ²Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia, Spain. ³Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, Apdo 22012, 46071, Valencia, Spain. ⁴Unidad Mixta de Investigación UPV-Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia, Spain. ✉e-mail: mmiranda@qim.upv.es; landreu@qim.upv.es

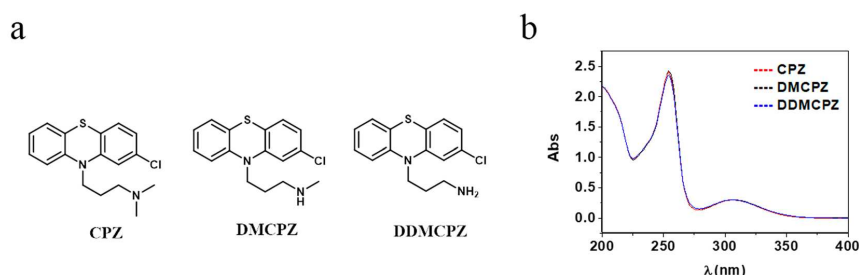


Figure 1. (a) Chemical structures of chlorpromazine (CPZ) and its *N*-demethylated metabolites demethylchlorpromazine (DMCPZ) and didemethylchlorpromazine (DDMCPZ). (b) UV absorption spectra of CPZ, DMCPZ, DDMCPZ in PBS at 10^{-5} M.

allow an accurate assessment of mutations provided that the gene area covered is large, and the sequencing is deep enough, and they are straightforward, can be easily standardized and, nowadays, are affordable.

It is well known that chlorpromazine (CPZ), a neuroleptic drug used in the treatment of schizophrenia, can induce photosensitivity reactions^{16,17}. Moreover, during phase I of metabolism, CPZ undergoes mono-*N*-demethylation and di-*N*-demethylation in the side chain. In this context, we have previously reported that demethylation of CPZ leads to metabolites demethylchlorpromazine (DMCPZ) and didemethylchlorpromazine (DDMCPZ), which maintain identical chromophore to the parent drug (Fig. 1), does not result in a detoxification but leads to an even enhanced photogenotoxicity¹⁸.

With this background, the aim of the present work is to evaluate the photomutagenicity of CPZ and its *N*-demethylated metabolites by means of the COMET assay and to test the potential of NGS as an alternative and straightforward procedure to assess photomutagenesis.

Methods

Chemicals and reagents. Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) was provided by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Demethylchlorpromazine (DMCPZ) and didemethylchlorpromazine (DDMCPZ) were synthesized as previously reported¹⁸. Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and penicillin-streptomycin were purchased from Invitrogen (Madrid, Spain). Trypsin and L-glutamine solutions were supplied by Cultek (Madrid, Spain). Phosphate buffer saline sterile solutions (0.01 M, pH 7.4) were prepared in ultrapure water obtained from a Milli-Q water purification system. For single cell electrophoresis (COMET) assay, the electrophoretic tank and lysis solution were provided by Trevigen (Gaithersburg, USA), low melting point agarose was provided by Pronadisa (Madrid, Spain), and the SYBR Gold was obtained from Invitrogen. All other reagents were of HPLC grade and used without additional purification.

Absorption spectral measurements. Ultraviolet absorption spectra of CPZ, DMCPZ and DDMCPZ were recorded on a Shimadzu UV-1800 UV/VIS spectrophotometer. Measurements were performed in PBS (10^{-5} M) using 1 cm quartz cells with 3.5 mL capacity at room temperature.

Cell culture experiments. The human skin fibroblast cell line (FSK) was cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 4 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. The cells were routinely maintained in exponential growth (weekly passages, 1:3 splitting ratio) in 75 cm² plastic flasks in a humidified incubator at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. The day of the experiments, cells were first trypsinized, resuspended in cold PBS and allowed to recover at 4 °C for 2 hours (trypsin detachment generates mild DNA damage in FSK cell line). Then, FSK cells were seeded in duplicate at 1.0×10^5 cell/well or 2.0×10^6 cell/well in 24 or 6 well-plate for COMET assay or photomutagenicity studies respectively, and incubated at 37 °C in a CO₂ incubator (100% relative humidity and dark conditions) with 10 μM of CPZ, DMCPZ or DDMCPZ solutions for 30 minutes. After incubation, one plate was placed in the multi-lamp photoreactor to irradiate the cells whereas the other one was kept in a dark box as a negative control.

Both COMET assay and photomutagenicity studies included ketoprofen (KP, 10 μM) as positive control. Cells were pretreated with KP at 37 °C in a CO₂ incubator (100% relative humidity and dark conditions) for 30 minutes before the irradiation step.

Irradiation procedure. All irradiation experiments were carried out with a photoreactor LZC-4 fitted with six top and eight side-UVA lamps ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm; Luzchem, Canada), which emit 94% UVA radiation and 2% UVB radiation. The plastic lid does not absorb beyond 310 nm, which contributes to the mitigation of the effect of UVB radiation over the cell cultures. The irradiance was determined using a calibrated power meter detector, resulting an irradiance of 7 mW/cm². The irradiations were performed through the lid of the plates for five minutes in order to achieve a UVA dose equivalent to 2 J/cm². The viability rate of treated cells after UVA irradiation was higher than 85%, indicating the suitability of the UV dose to overcome false-positive results triggered by extensive DNA fragmentation promoted by cell death. To prevent cell cultures from unwanted overheating, plates were kept on ice during the irradiation step and the temperature was regulated by ventilation.

Sample ID	Total number of reads	Total number of bases (mbp)	Mean coverage depth (fold)	Coverage within the target region (%)
CPZ_T0	71217	10.2638	448.05	100
CPZ_T5	79209	11.3726	496.37	100
FSK_T0	57750	8.3150	363.15	100
FSK_T5	55302	7.8122	341.58	100
DMCPZ_T0	83100	12.0291	525.74	99.82
DMCPZ_T5	87788	12.5787	549.36	99.98
DDMCPZ_T0	88685	12.7070	541.75	100
DDMCPZ_T5	86673	12.4188	542.69	100

Table 1. Summary of the NGS quality control metrics in the samples studied.

Evaluation of cellular photogenotoxicity by COMET assay. Irradiated and non-irradiated cell suspensions (100 μ L) were carefully mixed with 100 μ L of 1% low melting point agarose, and the drops were loaded on Trevigen treated slides placed on ice until jellification (2×10^4 cells/gel). Then, slides were immediately subjected to cell lysis by incubation overnight in cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100) or maintained in DMEM medium at 37 °C for 3 h and 6 h, and then lysed, to promote intrinsic cellular DNA-repair mechanisms. Next day, all slides were placed in the electrophoretic tank, covered with cold alkaline buffer (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA, pH ≥ 13) and left during 40 min for DNA unwinding. Afterwards, the electrophoresis was carried out at 21 V (1 V/cm) for 30 minutes at 4 °C. Once the electrophoresis ended, the slides were washed twice in PBS for 5 min. DNA was fixed by two subsequent incubations in 70% ethanol and 100% ethanol. DNA comets and tails were stained with SYBR Gold (1:10,000) for 30 min (λ_{exc} : 495 nm and λ_{em} : 537 nm). Finally, the slides were air-dried and kept in darkness until their visualization. Visualization of comet nucleoids and tails was carried out with a Leica DMI 4000B fluorescence microscope using the Fluorescein FITC filter. At least 5 pictures of each sample were taken in order to determine DNA damage. The percentage of DNA damage of each sample was calculated with the visual scoring of at least 100 DNA Comets using the following equation: $[(N_{class\ 0\ Comets} \times 0) + (N_{class\ 1\ Comets} \times 1) + (N_{class\ 2\ Comets} \times 2) + (N_{class\ 3\ Comets} \times 3) + (N_{class\ 4\ Comets} \times 4) + (N_{class\ 5\ Comets} \times 5) + (N_{class\ 6\ Comets} \times 6)]/6$, where class 0 comets indicate comets with no DNA damage and class 6 comets indicate comets with maximum DNA damage.

Photomutagenicity studies. Irradiated and non-irradiated samples were centrifuged at 1500 rpm for 5 min and cellular pellet was harvested and kept at -20 °C until DNA extraction. Thus, DNA extraction was carried out according to standard procedures, by using phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction and ethanol precipitation. The DNA was dissolved in sterile 100 mM Tris hydrochloric acid, pH 8.0, and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid at a final concentration of 400 to 600 μ g/mL, and stored at 4 °C in sterile plastic vials. Mutagenicity studies were carried out by means of targeted deep sequencing (Ion PGM Targeted Sequencing, Life Technologies). *BRCA1* and *BRCA2* were selected as the reporter genes based on the availability of straightforward and inexpensive analyses and because of the high bp coverage comprised in the analyses. The chromosomal regions analysed correspond to well-known genes related to breast cancer since more than two decades ago^{19,20}. The analyses covered 24,830 bp, 167 amplicons and the mean coverage was always higher than 340 x. Quality control data for the sequencing analyses are summarized in Table 1.

Results and Discussion

As stated above, in the photogenotoxicity studies for CPZ, DMCPZ and DDMCPZ carried out with cellular DNA, COMET assay revealed that the metabolites were more photogenotoxic than CPZ itself¹⁸. Therefore, to assess whether the cells can repair DNA damage photosensitized by CPZ and its *N*-demethylated metabolites after several hours, COMET assay of FSK cells treated with CPZ, DMCPZ or DDMCPZ was carried out after UVA light irradiation followed by 3 h or 6 h of cell recovery. Thus, the remaining DNA damage was calculated by using a classification of 6 DNA damage categories⁸.

As shown in Fig. 2 and Supplementary Fig. S1, DNA damage decreased with the time of recovery only for CPZ whereas the *N*-demethylated metabolites remained unchanged. Interestingly, for the parent drug CPZ it was observed a significant reduction in DNA damage following 6 h recovery. By contrast, for DMCPZ and DDMCPZ no substantial decrease of DNA damage was noticed after 6 h of cell recovery.

The gene areas sequenced contained several polymorphic regions and all polymorphisms identified were analyzed to assess mutagenicity. The gene locations on Assembly GRCh37 and identification numbers for the gene variations when available are shown in Table 2. Every irradiated sample ($T = 5$) was compared to a non-irradiated sample with identical composition of chlorpromazine or metabolites ($T = 0$). Mutagenesis was, therefore, assessed as the net difference between the percentage of the increase in heterogeneity for every variant at time = 5 versus time = 0 for the seven SNVs found in heterozygosity. Then, the average of all net differences in heterozygosity for all the SNVs mentioned above was used to assess the mutagenesis effect as shown in Fig. 3.

Our findings show that the extent of DNA changes as assessed with NGS was similar as that observed by the COMET assay, as shown in Fig. 3: Cells without treatment (FSK) showed negligible DNA changes, the effect of CPZ lower than that of DMCPZ and DDMCPZ and, finally, the effect of KP is low. A minor discrepancy, however, is observed with DDMCPZ, which seems to cause more DNA changes as assessed by NGS than that assessed with the COMET assay. We have no explanation for this difference, although we could speculate that NGS could provide

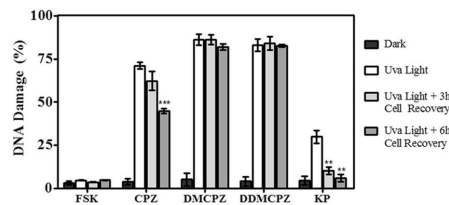


Figure 2. Alkaline single cell gel electrophoresis COMET assay of cells treated (10 μ M) with CPZ, DMCPZ or DDMCPZ. Cells without treatment (FSK) or cells treated with S-Ketoprofen (KP) were used as negative and positive control, respectively. Cells were treated, incubated for 30 minutes at 37 $^{\circ}$ C and then left unexposed (Dark, ■), irradiated at 2 J/cm² dose (UVA Light, □) or irradiated at 2 J/cm² dose followed by 3 h or 6 h of cell recovery: UVA Light + 3 h cell recovery, ■ and UVA Light + 6 h cell recovery, ■, respectively. The percentage of DNA damage was obtained for compounds tested by visual scoring. Data are the mean $\pm$ SD of 4 independent experiments. Asterisks denote significant differences relative to treated and irradiated FSK cells by means of the t-Student test (**p < 0.01; ***p < 0.001).

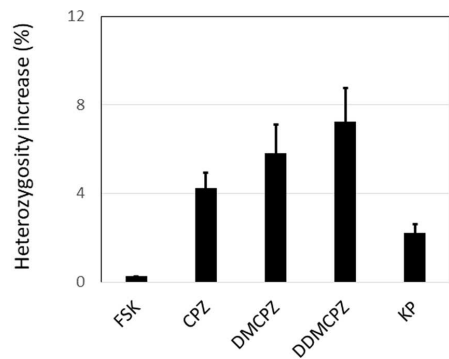


Figure 3. Extent of mutagenesis assessed with NGS. Each bar shows the mean $\pm$ SE in the increase of heterogeneity (deviations from 50%) for all SNVs observed in heterozygosity in this study (Table 2). T-Test indicated statistically significant differences (p < 0.001) for all comparisons between irradiated drug-treated cells versus irradiated FSK-cells.

Position	Random SNP Identification	Hereozygous in the FSK cell line	Type of variant	Percentage of heterozygosity under basal conditions
chr13:32907420	rs397507608	No	—	—
chr13:32907615	—	Yes	A/ATATCT	49.12 $\pm$ 3.36
chr13:32912299	rs543304	Yes	C/T	51.65 $\pm$ 3.72
chr13:32912345	rs80359406	No	—	—
chr13:32913055	rs206075	yes	C/T	49.42 $\pm$ 1.75
chr13:32915005	rs206076	Yes	C/G	48.55 $\pm$ 2.47
chr13:32929387	rs169547	Yes	C/T	48.21 $\pm$ 2.66
chr13:32944741	rs11571744	Yes	C/T	48.24 $\pm$ 2.94
chr13:32954302	—	No	—	—
chr13:32968808	—	No	—	—
chr17:41244936	rs799917	Yes	T/C	49.37 $\pm$ 2.56
chr17:41245586	—	No	—	—
chr17:41276170	—	No	—	—

Table 2. Gene variations analyzed. Chromosomal locations correspond to the Assembly GRCh37. Basal conditions represent non-irradiated and non-drug exposed cells.

higher sensitivity or a higher discrimination capacity when a high level of DNA damage is achieved. Even with the minor discrepancy observed with DDMCPZ, the Pearson Correlation Coefficient (R value) for the comparison between the results obtained by NGS and the COMET assay is very high = 0.9530. Although additional comparative studies are required to prove whether NGS can be even more sensitive than the COMET assay, our findings confirm that NGS has potential for DNA damage assessment thus adding more uses to this powerful sequencing technique.

It should be stated that, because DNA is collected shortly after cell irradiation, the DNA changes observed by NGS are not fixed in the cell genome and, therefore, the presence of mutations in the NGS study does not mean that these mutations will be permanent. Permanent mutations cannot be detected after cell treatment with drug or its metabolites and irradiation, because this combination promotes cell death in FSK cells after 24 h assessed by trypan-blue exclusion assay (data not shown). Indeed, high cell viability is a requirement to avoid misleading results as cell death also promotes DNA fragmentation by activation of caspase-activated DNases (CADs). We analyzed DNA damage 3 h after cells were incubated with drug or metabolites followed by UVA irradiation, when cell viability is higher than 85%. Therefore, it may be argued that the mutations detected by means of NGS may result from an artifact of amplification of damaged DNA. However, this is unlikely because the total number of reads, bases and the coverage of the NGS experiments are similar in irradiated and non-irradiated cells (Table 1). Therefore, although the DNA changes detected by NGS are not permanent, they reflect DNA variation after irradiation. Another potential limitation is that our findings are based on the seven SNVs observed in heterozygosity in the cells, and that this procedure is limited as compared to other strategies such as classic shuttle vectors, or even specific genes sequenced individually after cloning in bacteria. However, NGS procedures have the advantage of the speed of the process, and the correlation of the results obtained by NGS assessment and the COMET assay is, at least in this pilot study, very high.

In conclusion, the combination of the single cell gel electrophoresis (COMET) assay and next generation sequencing (NGS) has been successfully applied to assess the photomutagenicity of CPZ, a well-known neuroleptic drug, in comparison with its *N*-demethylated metabolites DMCPZ and DDMCPZ. Upon exposure to the UVB-UVA fraction of ultraviolet radiation contained in sunlight, the COMET assay reveals CPZ-photosensitized DNA damage that is partially repaired by cells after several hours. By contrast with this result, the metabolites DMCPZ and DDMCPZ mediate extensive DNA-photodamage, which is hardly repaired under the same conditions. Parallel assessment of the extent of DNA changes by means of NGS are consistent with these observations, showing the same trend with minor discrepancies for DDMCPZ. To our knowledge, this is the first example demonstrating the utility of NGS for assessing drug-induced photomutagenicity. Further NGS studies in different comet DNA fractions separately, might refine the potential of NGS in photomutagenicity assessment.

Received: 14 January 2020; Accepted: 2 April 2020;

Published online: 23 April 2020

References

1. Bjelland, S. & Seeberg, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* **531**, 37–80 (2003).
2. Friedberg, E. C. A brief history of the DNA repair field. *Cell Res.* **18**, 3–7 (2008).
3. Cadet, J. & Wagner, J. R. DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
4. Bauer, N. C., Corbett, A. H. & Doetsch, P. W. The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10083–10101 (2015).
5. Cadet, J. & Davies, K. J. A. Oxidative DNA damage & repair: An introduction. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 2–12 (2017).
6. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
7. Roos, W. P., Thomas, A. D. & Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 20–33 (2016).
8. Møller, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res.* **612**, 84–104 (2006).
9. Azqueta, A. & Collins, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch. Toxicol.* **87**, 949–968 (2013).
10. Collins, A. R. *et al.* Controlling variation in the comet assay. *Front. Genet.* **5**, 359 (2014).
11. Møller, P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis* **33**, 1–7 (2018).
12. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–1145 (2008).
13. Metzker, M. L. Sequencing technologies—the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31 (2010).
14. Gawad, C., Koh, W. & Quake, S. R. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 175–188 (2016).
15. Schwarz, U. I., Gullilat, M. & Kim, R. B. The Role of Next-Generation Sequencing in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, (2019).
16. Epstein, J. H., Brunsting, L. A., Petersen, M. C. & Schwarz, B. E. A study of photosensitivity occurring with chlorpromazine therapy. *J. Invest. Dermatol.* **28**, 329–338 (1957).
17. Kochevar, I. E., Chung, F. L. & Jeffrey, A. M. Photoaddition of chlorpromazine to DNA. *Chem. Biol. Interact.* **51**, 273–284 (1984).
18. Palumbo, F. *et al.* Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **313**, 131–137 (2016).
19. Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66–71 (1994).
20. Wooster, R. *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789–792 (1995).

Acknowledgements

This study was funded by the Carlos III Institute (ISCIII) of Health (Grants: PI15/00303, PI18/00540, PI16/01877, CPII16/00052, the Thematic Networks and Co-operative Research Centres: ARADyAL RD16/0006/0004 and RD16/0006/0030), IB16170, GR18145 from Junta de Extremadura, Spain, co-funded by European Regional Development Fund and Generalitat Valenciana Prometeo/2017/075. We would also like to thank M. Dolores Coloma for technical assistance in the preliminary experiments.

Author contributions

Author contributions are as follows: J.A.G.A. and E.G.-M. supervised, interpretation and analyzed data from NGS assays and wrote this part of the MS; G.G.-L. performed and analyzed data for COMET test; M.A.M. and I. Andreu: conceived and coordinated the work, discussed the results and wrote the manuscript. All authors have substantially contributed to this work and agree to be accountable for the content.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63651-y>.

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

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

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



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

© The Author(s) 2020



In vitro assessment of the photo(geno)toxicity associated with Lapatinib, a Tyrosine Kinase inhibitor

Guillermo García-Lainez¹ · Ignacio Vaya^{2,3} · M. Pilar Marín¹ · Miguel A. Miranda^{2,3} · Inmaculada Andreu^{2,3}

Received: 11 June 2020 / Accepted: 12 August 2020 / Published online: 19 August 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The epidermal growth factor receptors EGFR and HER2 are the main targets for tyrosine kinase inhibitors (TKIs). The quinazoline derivative lapatinib (LAP) is used since 2007 as dual TKI in the treatment of metastatic breast cancer and currently, it is used as an oral anticancer drug for the treatment of solid tumors such as breast and lung cancer. Although hepatotoxicity is its main side effect, it makes sense to investigate the ability of LAP to induce photosensitivity reactions bearing in mind that BRAF (serine/threonine-protein kinase B-Raf) inhibitors display a considerable phototoxic potential and that afloqualone, a quinazoline-marketed drug, causes photodermatitis. Metabolic bioactivation of LAP by CYP3A4 and CYP3A5 leads to chemically reactive *N*-dealkylated (*N*-LAP) and *O*-dealkylated (*O*-LAP) derivatives. In this context, the aim of the present work is to explore whether LAP and its *N*- and *O*-dealkylated metabolites can induce photosensitivity disorders by evaluating their photo(geno)toxicity through in vitro studies, including cell viability as well as photosensitized protein and DNA damage. As a matter of fact, our work has demonstrated that not only LAP, but also its metabolite *N*-LAP have a clear photosensitizing potential. They are both phototoxic and photogenotoxic to cells, as revealed by the 3T3 NRU assay and the comet assay, respectively. By contrast, the *O*-LAP does not display relevant photobiological properties. Remarkably, the parent drug LAP shows the highest activity in membrane phototoxicity and protein oxidation, whereas *N*-LAP is associated with the highest photogenotoxicity, through oxidation of purine bases, as revealed by detection of 8-Oxo-dG.

Keywords Anticancer drug · Cellular phototoxicity · DNA damage · Metabolites · Protein photooxidation

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02880-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miguel A. Miranda
mmiranda@qim.upv.es

✉ Inmaculada Andreu
iandreu@qim.upv.es

¹ Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain

² Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

³ Unidad Mixta de Investigación UPV-Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain

Introduction

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is the main target for tyrosine kinase inhibitors (TKIs). It is known that TKIs bind to tyrosine kinase ATP-binding sites and can be classified into TKIs that bind to EGFR alone or dual TKIs, which bind to both EGFR and HER2 (human epidermal growth factor receptor two) receptors (Mendelsohn and Baselga 2000). These receptors regulate the downstream cell signaling pathways involved in cell growth, survival, and differentiation. In particular, overexpression of the HER2 is responsible for nearly 20% of breast cancers and is associated with limited patient survival (Ding et al. 2020; Gomez et al. 2008; Spector et al. 2007).

In this context, the quinazoline derivative lapatinib (LAP) was approved by the FDA in 2007 for use as dual TKI in the treatment of metastatic breast cancer, in combination with other chemotherapeutic agents (Gavilá et al. 2020; Geyer et al. 2006; Higa and Abraham 2007; Kopper 2008; Medina and Goodin 2008). Currently, it is used as an oral anticancer

drug for the treatment of solid tumors such as breast and lung cancer (Huijberts et al. 2020; Nolting et al. 2014; Schroeder et al. 2014; Wang 2014). Moreover, cytotoxic and genotoxic effects of LAP on the triplet negative breast cancer cell line MDA-MB-231 have been proven, confirming its effectiveness for the treatment of breast cancer (Abo-Zeid et al. 2019), which is considered one of the most commonly diagnosed cancers worldwide, generally in women (Ferlay et al. 2015; Frenel et al. 2009).

Metabolic bioactivation of LAP by mainly cytochromes CYP3A4 and CYP3A5 leads to chemically reactive metabolites such as *N*-dealkylated (*N*-LAP) and *O*-dealkylated (*O*-LAP) derivatives (Towles et al. 2016).

The main side effects of LAP include hepatotoxicity, diarrhea, rash, pruritus, and nausea. In particular, LAP-induced hepatotoxicity is idiosyncratic in nature (Castellino et al. 2012; Moon et al. 2019; Rayane Mohamed 2018). It has been pointed out that the reactive metabolites may be responsible for direct or indirect toxicity to cellular proteins or DNA; however, the underlying mechanisms remain unclear (Parham et al. 2016; Spraggs et al. 2011). Moreover, it makes sense to investigate the ability of LAP to induce photosensitivity reactions bearing in mind that BRAF (serine/threonine-protein kinase B-Raf) inhibitors show a considerable phototoxic potential after exposure to UVA light (Heppt et al. 2020). Besides, it has been reported that aflqualone, a quinazoline-marketed drug, causes photodermatitis as a side effect (Tokura et al. 1994).

In oncotherapy, it is critical that dermatologists both understand the toxicity mechanism and recognize clinical signs and symptoms to provide effective clinical management. In this context, it is known that EGFR inhibitors

generate a unique constellation of skin toxicities among which is photosensitivity (Macdonald et al. 2015).

Interestingly, we have demonstrated in previous works that drug-metabolism can result in phototoxicity enhancement (Agundez et al. 2020; Garcia-Lainez et al. 2018; Palumbo et al. 2016). In this context, Fig. 1 shows the absorption spectra of LAP, *N*-LAP, and *O*-LAP in cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) micelles, as a model of the lipophilic environment that mimics biological membranes. As the two metabolites maintain the LAP chromophore unaltered, they also display an absorption band centered at 380 nm, which overlaps with the active fraction of sunlight able to produce photosensitivity disorders.

With this background, the goal of the present work is to explore whether LAP and its *N*- and *O*-dealkylated metabolites have the capability to induce photosensitivity disorders. This has been achieved through evaluation of their photo(geno)toxicity by means of in vitro studies, including cell viability as well as photosensitized protein and DNA damage.

Materials and methods

General reagents

All solvents were of the highest grade commercially available. Chlorpromazine hydrochloride (CPZ; CAS 69-09-0), sodium dodecyl sulphate (SDS; CAS 151-21-3), anthracene (CAS 120-12-7) and lapatinib (LAP; CAS 231277-92-2) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). *N*-De [N-De [2-(methylsulfonyl) ethyl] lapatinib

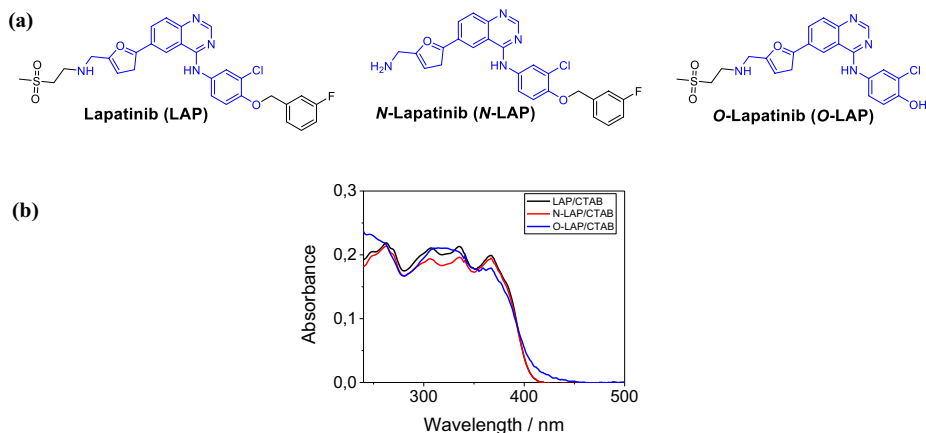


Fig. 1 **a** Chemical structure of Lapatinib (LAP), *N*-Lapatinib (*N*-LAP) and *O*-Lapatinib (*O*-LAP). **b** Absorption spectra of LAP and its metabolites in CTAB micelles in aqueous solutions at 5 μ M

(*N*-LAP, CAS 697299-82-4) and *O*-De (3-fluorobenzyl) lapatinib ditosylate salt (*O*-LAP; CAS 1268997-70-1) were provided by Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) and Toronto Research Chemicals (North York, Canada), respectively. LAP, *N*-LAP and *O*-LAP stock solutions were prepared in DMSO as vehicle, whereas CPZ and SDS were dissolved in ultrapure water (Milli-Q®). Plasmid pBR322 was purchased from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain) and low melting point agarose was provided by Pronadisa (Madrid, Spain). SYBR™ Safe and SYBR™ Gold DNA stains were supplied by Invitrogen (Madrid, Spain). DNA repair enzyme T4 endonuclease V (Endo V) was provided by Werfen (Barcelona, Spain) and DNA repair enzymes endonuclease III (Endo III) and *E. coli* formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) were from Sigma-Aldrich. Culture cells genomic DNA extraction kit was purchased from Neo-Biotech (Nanterre, France). For cell culture experiments, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), and penicillin–streptomycin (1.0×10^5 U/mL, 1.0×10^5 µg/mL) were supplied by Invitrogen. Trypsin–EDTA (0.25–0.02%) and glutamine (100 mM) solutions were provided by Cultek (Madrid, Spain). Phosphate buffered saline buffer (PBS; 0.01 M, pH 7.5), neutral red dye, Human Serum Albumin (HSA) and protein carbonyl content assay kit was obtained from Sigma-Aldrich. Reagent kits for single cell electrophoresis assay and 8-Oxo-dG Elisa were provided by Trevigen (Barcelona, Spain). CellMask™ Orange Plasma membrane stain was supplied by Invitrogen and mowiol by Calbiochem.

Cell culture conditions

BALB/c 3T3 mouse fibroblast cell line and human skin fibroblasts (FSK) were cultured in 75 cm² plastic flasks in DMEM supplemented with 10% FBS, 4 mM L-Glutamine and penicillin/streptomycin (100 U/mL, and 100 µg/mL) in a humidified incubator (100% relative humidity) at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. Cells were routinely passed twice a week (1:4 and 1:10 splitting ratios for FSK and 3T3 cells, respectively) and viability of the cultures was checked by trypan blue exclusion assay before each experiment.

Absorption and emission spectra measurements

Absorption spectra were recorded in a JASCO V-760 spectrophotometer. For fluorescence experiments, 5 µM of LAP, *O*-LAP and *N*-LAP in DMEM were incubated for 1 h in black 96-well plates in the presence of FSK cells (8,000 cells/well). Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) were recorded using a Synergy H1 multi-mode microplate reader.

Cellular localization by confocal microscopy

Fibroblast cells were seeded on glass coverslips in 24 well-plates (5.0×10^4 cells/well). Next day, DMEM medium was replaced by 500 µL of drug solutions (LAP, *N*-LAP or *O*-LAP) at 5 µM containing CellMask™ Orange Plasma membrane stain (dilution 1:20,000) and incubated for 30 min at 37 °C. Then, coverslips were washed twice for 5 min with PBS and finally mounted with mowiol. Microscopy and imaging were performed with a Leica SP5 confocal microscope using sequential mode. The excitation wavelengths were 405 nm for LAP, *N*-LAP and *O*-LAP and 543 nm for CellMask™ Orange Plasma membrane and maxima emission wavelengths were 450 and 567 nm, respectively. Representative images were selected from at least three different regions on the slide.

Irradiation equipment

All UVA irradiations were carried out with an LCZ-4 photoreactor fitted with six top and eight sides Hitachi lamps ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm, Gaussian distribution; Luzchem, Canada), which emit 94% UVA radiation and 2% UVB radiation. Samples were irradiated using 96-well transparent plates for the in vitro 3T3 NRU phototoxicity assay and photosensitized damage to plasmid DNA assay and 24-well transparent plates for the protein photooxidation assay, comet assay and 8-Oxo-dG determination assay. The irradiations were performed through the lid of the plates which does not absorb beyond 310 nm. This mitigates the direct effect of UVB radiation over the cell cultures. In photogenotoxicity experiments, the cell viability of cultures after irradiation was higher than 85%, indicating the suitability of the UV dose to avoid false-positive results triggered by DNA fragmentation due to cell death. In all experiments, to avoid overheating plates were kept on ice inside the photoreactor during the irradiation step and the temperature remained under control by ventilation.

In vitro 3T3 neutral red uptake (NRU) phototoxicity assay

The in vitro 3T3 NRU phototoxicity test was carried out following the OECD Guideline 432 (OECD 2004) with minor modifications described in Garcia-Lainez et al. (2018). CPZ and SDS were used as the positive phototoxic and negative non-phototoxic control, respectively. In brief, for each compound two 96-well plates seeded at a density of 2.5×10^4 cells/well. Next day, 3T3 cells were incubated with test compounds (LAP, *N*-LAP and *O*-LAP) at eight concentrations ranging from 0.1 µM to 100 µM for an hour in dark conditions. Afterwards, one plate was irradiated on ice for 12 min with a non-cytotoxic dose of UVA equivalent to 5 J/

cm^2 whereas the other was kept in a dark box. Later, compound solutions were replaced with freshly DMEM medium and plates were further incubated overnight. After that time, neutral red solution (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added into the wells and incubated for 2 h at 37 °C. Cells were then washed once with PBS and neutral red was extracted from lysosomes in 100 μL of the extraction buffer [distilled water 50% (v/v), ethanol 49.5% (v/v) and acetic acid 0.5% (v/v)]. Finally, absorbance was read at 540 nm on a Synergy H1 microplate reader. For each compound dose–response curves were established to determine the concentration reducing a 50% the neutral red uptake (IC₅₀) in dark and UVA light conditions. Afterwards, photoirritation factor (PIF) values were calculated using the subsequent equation: $\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ DARK}}{\text{IC}_{50} \text{ UVA LIGHT}}$. According to OECD Guideline 432, a compound is labelled as “non-phototoxic” when PIF is < 2, “probably phototoxic” if PIF is between 2 and 5 and “phototoxic” if PIF is > 5.

Protein photooxidation assay

Solutions of HSA (5 mg/mL, 1 mg protein/sample) in PBS were prepared and irradiated alone or in the presence of 30 μM of LAP, *O*-LAP or *N*-LAP with an UVA dose of 15 J/cm² as described above. Immediately after irradiation, the extent of HSA oxidation in all samples was measured spectrophotometrically by incubation during 10 min with 100 μL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) at room temperature to form stable dinitrophenyl hydrazone adducts. After incubation, proteins were precipitated by the methanol/chloroform method followed by its re-solubilization in guanidine buffer (6 M). Finally, absorbance at 375 nm was recorded using the Synergy H1 microplate reader and the HSA oxidation degree was expressed as nmol of carbonyl per mg protein.

Photosensitized damage to plasmid DNA

Samples containing the drug (LAP) or its metabolites (30 μM) in PBS with 1 mg/mL HSA and 250 ng of supercoiled pBR322 were prepared. Then, mixtures were either kept in dark conditions or irradiated during 30 min (15 J/cm²). Immediately after irradiation, loading buffer (0.25% bromophenol blue, 30% glycerol, in water) was added to each sample. To reveal the nature of the DNA damage, DNA-repair enzymes experiments were also performed. To this purpose, after the irradiation step samples were digested with an excess of Endo V, Endo III or FPG (0.5 U) at 37 °C for 1 h and then, loading buffer added as detailed above. Next, all samples were loaded on a 1% agarose gel containing SYBR[®] Safe as nucleic acid stain. The electrophoresis was run in TAE Buffer (0.04 M Tris–acetate, 1 mM EDTA) at 100 V for 1 h. Finally, the agarose gels were visualized with the Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) and

the intensity of Form I (supercoiled) and Form II (nicked relaxed) bands was quantified using the Image-J software. Finally, the relative amount of the Form II of the plasmid was calculated.

Nuclear DNA damage by single cell gel electrophoresis (comet) assay

Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) was performed as previously described by Garcia-Lainez et al. (2018) to allow the detection of both single and double strand breaks and alkaline labile sites on nuclear DNA. Thus, FSK cell cultures in exponential growth were trypsinized, resuspended in cold PBS and placed on the ice during 2 h as trypsin detachment induces mild DNA damage in FSK cell line. Then, two 24-wells plates (1.0 × 10⁵ cells/well) were seeded and treated with 30 μM of LAP or its metabolites (*N*-LAP or *O*-LAP) for 1 h at 37 °C in darkness. CPZ (10 μM) was used as the reference photogenotoxic control of this assay. After incubation, one plate was placed in the photoreactor to irradiate the cells (2.5 J/cm²) and the other one was kept in darkness as negative control. Later, irradiated and non-irradiated cells were harvested from plates and mixtures of 100 μL of cell suspension (2.0 × 10⁴ cells) and 100 μL of 1% low melting point agarose solution were prepared and loaded onto Trevigen[®] treated slides. Slides were placed on ice-cold tray to allow drop jellyfication. Afterwards, slides were immersed in coupling jars with lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, and 0.01 M Tris, 1% TritonX-100, pH 10) to promote cell lysis and incubated overnight at 4 °C. Next day the Trevigen[®] comet assay electrophoresis tank was loaded with slides and filled with 850 mL cold alkaline electrophoresis buffer (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA in distilled water and pH ≥ 13). The samples were incubated for 40 min at 4 °C to allow DNA unwinding. The electrophoresis was run at 21 V (1 V/cm) for 30 min at 4 °C and then the slides were washed twice in PBS for 5 min. DNA fixation was achieved by two subsequent incubations in 70% ethanol and 100% ethanol solutions during 5 min and air-dried. Nuclear DNA was stained with a SYBR Gold[®] (1:10.000 TE buffer) bath for 30 min, air-dried and kept in darkness until its visualization. Visualization of nucleoids and tails of the samples was carried out with a Leica DMI 4000B fluorescence microscope. For each sample at least five pictures were taken. Finally, DNA damage of each sample was calculated for each condition analyzing at least 100 DNA comets by visual scoring. Total comet score (TCS) was determined with the classification of six DNA damage categories (Møller, 2006) with the following formula: $[(\text{Nclass } 0 \text{ comets} \times 0) + (\text{Nclass } 1 \text{ comets} \times 1) + (\text{Nclass } 2 \text{ comets} \times 2) + (\text{Nclass } 3 \text{ comets} \times 3) + [(\text{Nclass } 4 \text{ comets} \times 4) + (\text{Nclass } 5 \text{ comets} \times 5) + (\text{Nclass } 6 \text{ comets} \times 6)]/6$ and expressing results in 1–100 arbitrary units, where class 0

comets are comets with no DNA damage and class 6 comets indicate comets with maximum DNA damage.

Assessment of 8-Oxo-dG as a biomarker of oxidative DNA damage

In this experiment, FSK cells were seeded in two 24-well plates at a density of 7.5×10^5 cells/well and treated with 30 μ M of LAP, *N*-LAP or *O*-LAP for 30 min at 4 °C in dark conditions. Then, one plate was irradiated with an UVA dose equivalent to 2.5 J/cm² and the other one was kept in dark conditions as negative control. Immediately, cells were harvested and genomic DNA extraction was performed in all samples according to the manufacturer's protocol. Purified DNA was quantified with a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) and the ratio A260/A280 was between 1.8 and 2.0. Next, 2 μ g DNA (100 ng/mL) was digested with DNase I (1 U) at 37 °C for 1 h, followed by alkaline phosphatase incubation (1 U) at 37 °C for 1 h. Finally, 8-Oxo-dG concentration was determined in all samples by a competitive ELISA assay following the manufacturer's instructions interpolating from the standard curve the sample concentration. Data were expressed in nanomoles of 8-Oxo-dG formed.

Data analysis and statistics

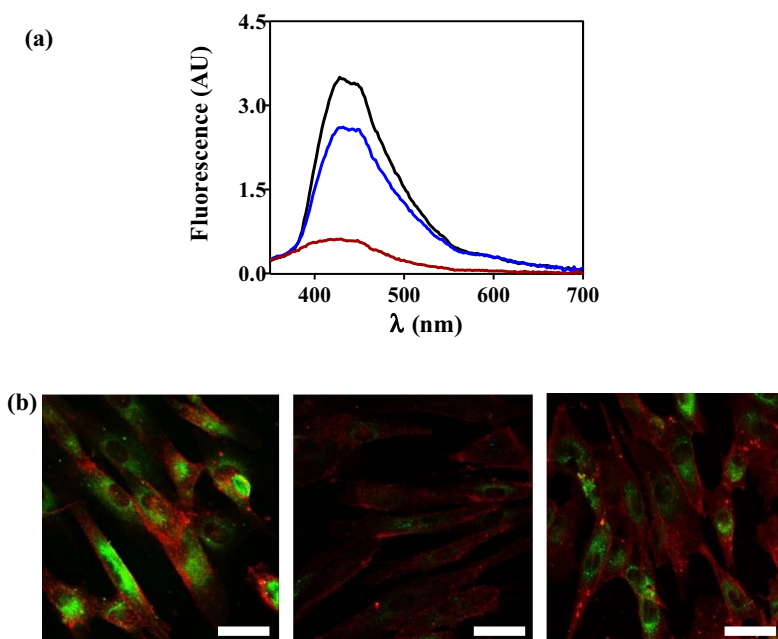
Results are presented as mean $\pm$ standard deviation obtained from the results of at least three independent experiments unless indicated otherwise. Data were analyzed and regression methods developed using the GraphPad software. Statistical significance was assessed by the t-Student test and p values lower than 0.05 were considered significant (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Results and discussion

In vitro cellular uptake of LAP and its metabolites

Fluorescence spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) of LAP, *N*-LAP and *O*-LAP were recorded after internalization into FSK cells (Fig. 2a). Fluorescence quantum yield (ϕ_F) of LAP and its metabolites were determined in FSK cells (Fig. S1), by comparison with anthracene as standard ($\phi_F = 0.27$ in ethanol) (Melhuish 1961). Thus, LAP showed a maximum emission around 450 nm with a $\phi_F = 0.25$; for *N*-LAP the spectral features remained unchanged, but with a decrease in its fluorescence yield ($\phi_F = 0.12$). Conversely, *O*-LAP displayed negligible fluorescence inside the cells ($\phi_F = 0.01$), pointing to a low intracellular photoactivity. Intracellular localization of LAP and its *N*- and *O*-dealkylated metabolites was

Fig. 2 **a** Emission spectra ($\lambda_{\text{exc}} = 320$ nm) of LAP (**black**), *N*-LAP (**blue**) and *O*-LAP (**red**) after internalization on FSK cells. **b** Intracellular localization of LAP (left), *O*-LAP (middle) and *N*-LAP (right) in FSK by confocal microscopy. Fibroblasts seeded on glass coverslips were incubated with 5 μ M solutions of LAP, *O*-LAP or *N*-LAP (green fluorescence) and further labeled with CellMaskTM Orange Plasma membrane (red fluorescence). A cytoplasmic distribution is observed for all compounds. White bars represent 50 μ m



analyzed by confocal microscopy using their intrinsic fluorescence properties. Following 30 min of incubation, the efficient uptake of all compounds by the cells was observed. Despite differences in their fluorescence intensity, all of them showed a cytoplasmic distribution without a predominant particular distribution in any organelle (Fig. 2b).

Cellular phototoxicity

Phototoxicity assay

The phototoxic potential of LAP, *N*-LAP and *O*-LAP was determined using the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. To this purpose, cell viability of BALB/c 3T3 fibroblasts treated with increasing concentrations of LAP or its metabolites in dark conditions or in combination with UVA light was measured by neutral red as a vital dye. Half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) under both conditions were estimated from dose–response curves (Fig. S2). The ultimate goal of the NRU assay is to calculate the photoirritation factor (PIF) of a compound, defined as the ratio between its IC₅₀ under dark or light conditions. Chlorpromazine, an anti-psychotic drug with well-known phototoxic properties, was used as a positive control of the assay (Palumbo et al. 2016). The obtained values are collected in Table 1. Parent drug LAP was clearly phototoxic with a PIF value of 21, while *O*-LAP metabolite did not exhibit any phototoxic potential (PIF 1). The lack of phototoxicity from *O*-LAP would be related to its lower photoactivity inside the cells, as inferred from its weak fluorescence emission. It is noteworthy that *N*-LAP metabolite retained the phototoxicity of the parent drug with a PIF value of 8. The decrease in the PIF of *N*-LAP could be attributed to an enhanced cytotoxicity of the metabolite under dark conditions with a five-fold reduction of the IC₅₀ in comparison with LAP.

Table 1 In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Assay of LAP and its metabolites

Compound	IC ₅₀ Dark (μM)	IC ₅₀ UVA Light (μM)	Photoirritant factor (PIF) ¹
CPZ	67 ± 9	3.7 ± 0.4	18
LAP	21 ± 4	1.0 ± 0.3	21
<i>O</i> -LAP	189 ± 42	231 ± 39	1
<i>N</i> -LAP	4.0 ± 0.7	0.5 ± 0.1	8
SDS	202 ± 25	244 ± 48	1

Data represent the mean ± SD from five independent dose-responses curves. CPZ and SDS were selected as positive and negative controls of phototoxicity, respectively

¹According to the OECD 432 Guide (2004), PIF < 2 means “no phototoxicity”

2 < PIF < 5 means “probable phototoxicity” and PIF > 5 means “phototoxicity”

Protein photooxidation

As stated above, LAP exerts its pharmacological activity in cancer cells through specific binding to the plasmatic membrane receptors EGFR and HER2, and its transport through the blood system is facilitated by interactions with serum proteins. Indeed, in previous work regarding photophysical studies of LAP, a high binding affinity to human serum albumin (HSA) was reported (Kabir et al. 2016). Hence, the photosensitizing properties of LAP and *N*-LAP towards proteins were investigated using HSA as model. Aqueous mixtures containing HSA and LAP, *N*-LAP, or *O*-LAP were UVA irradiated and the carbonyl moiety, as an early biomarker of oxidative damage, was quantified by 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization method. As shown in Fig. 3, irradiated HSA alone contained similar levels of carbonyl moiety as non-irradiated HSA, indicating the suitability of the UVA dose selected. As expected, *O*-LAP did not display any oxidative damage towards HSA. By contrast, both LAP and *N*-LAP significantly increased the carbonyl concentration in HSA after UVA irradiation, clearly suggesting the capability of these compounds to mediate photooxidation in cellular membranes. Noteworthy, this effect was higher for LAP than for *N*-LAP in agreement with the results obtained in the phototoxicity test.

Assessment of photogenotoxicity

Photosensitized damage to DNA

To investigate whether the phototoxicity displayed by LAP and its *N*-LAP metabolite can also involve damage to DNA bases, photocleavage experiments were performed with supercoiled plasmid pBR322 alone or in combination with DNA-repair enzymes. This assay is based on the conversion of native supercoiled form I into open circular form II upon UVA irradiation in the presence of a photosensitizing drug or metabolite taking advantage of the different electrophoretic mobility of both forms in an agarose gel. To reveal the nature of the base damage, the use of DNA-repair enzymes can be used. Thus, mixtures containing LAP or its metabolites and DNA plasmid pBR322 were irradiated to detect direct single strand breaks (ssb). Remarkably, agarose gel electrophoresis (Fig. S3a) revealed a higher photogenotoxicity for the *N*-LAP metabolite than for the parent drug LAP through formation of the open circular form II quantified by densitometry (Fig. S3b). As anticipated, *O*-LAP metabolite did not display any photogenotoxic effect towards plasmid pBR322. This result indicates again that LAP metabolism can modulate the potential to photosensitize DNA damage.

In another set of experiments, several DNA-repair enzymes T4 endonuclease V (Endo V), endonuclease III (Endo III) and formamidopyrimidine DNA glycosylase

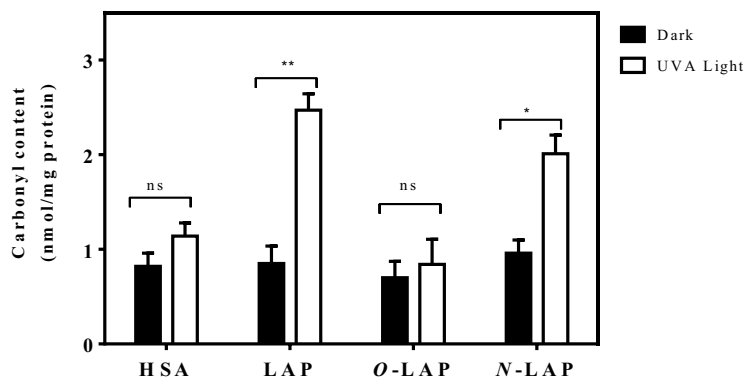


Fig. 3 Protein photooxidation by LAP and its metabolites. HSA solutions in PBS (5 mg/mL), alone (HSA) or in the presence of 30 μ M of LAP, O-LAP or N-LAP were irradiated with an UVA dose of 15 J/cm² (empty square, UVA Light) or kept in the dark conditions (Filled with square). Protein oxidation was spectrophotometrically evaluated

by monitoring its carbonyl moiety after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the carbonyl content in HSA in darkness by the *t* Student test (* p < 0.05, ** p < 0.01, ns: non-significant)

(FPG) were used to reveal cyclobutane thymine dimers, degradation products of pyrimidine bases and oxidized purines, respectively. As shown in Fig. 4, quantification by densitometry of form II plasmid showed that ssb formation was not significantly influenced by the Endo V (Fig. 4a) and Endo III (Fig. 4b) enzymes. Interestingly, ssb formation in the presence of FPG repair-enzyme was clearly enhanced only for the N-LAP metabolite (Fig. 4c), thus pointing to the selective generation of oxidatively damaged of purine bases in DNA by this metabolite upon UVA irradiation.

Evaluation of cellular DNA damage

In a cellular milieu, there are a large number of biomolecules and metabolites that could have a strong influence on the effect displayed by an added compound. Thus, photogenotoxicity was investigated in a cellular environment using single-cell gel electrophoresis or comet assay under alkaline conditions. This technique allows detecting strand breaks (single or double) as well as alkali-labile sites on chromosomal DNA of an individual cell. Thus, human dermal fibroblasts (FSK) were incubated for 1 h with LAP or its metabolites. After UVA exposure, cells were embedded in agarose on a slide, subjected to lysis, and then, electrophoresis was performed so that the damaged DNA could migrate away from the nucleus. Upon staining with SYBR Gold, the fluorescence patterns of the comet nucleoids and tails were analyzed, and the percentage of DNA damage calculated according to the classification of the images in six different categories. Comet assay evidenced that LAP in combination with UVA light promoted mild damage (around 30%) to cellular DNA (Fig. 5) as fragmented DNA moved

faster through agarose gel towards the anode, forming a tail (Inset Fig. 5 and Fig. S4).

This result could be explained by the higher sensitivity of the comet assay to detect DNA damage. By contrast, O-LAP metabolite did not show any photogenotoxicity as the nucleoids remained intact and resembled those from control cells, in agreement with the negative results obtained in previous assays. Once more, N-LAP metabolite displayed again higher photogenotoxicity than the parent drug LAP, with comets containing an enhanced DNA fluorescence in the tail (ca. 65% of DNA damage).

Oxidative DNA damage comprises a multitude of lesions, many of which are mutagenic and ultimately may lead to the development of photocarcinogenesis (Cadet and Davies 2017). One of the most widely studied lesions is the formation of 8-Oxo-dG (8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine) as a consequence of guanine base oxidation. To confirm the higher oxidative potential towards DNA promoted by N-LAP, 8-Oxo-dG production was measured in FSK cells using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA assay). Accordingly, after UVA irradiation, DNA from samples was isolated, and its quality and concentration were determined by UV spectroscopy to rule out extensive unspecific DNA degradation during the irradiation step. The 8-Oxo-dG concentration was calculated by interpolation from the calibration curve using a commercial standard. The results are shown in Fig. 6 and they revealed that after irradiation, the levels of 8-Oxo-dG in DNA of FSK cells significantly increased about two-fold for the N-LAP metabolite, whereas for the parent drug and O-LAP metabolite they remained constant, in line with the enzyme-repair plasmid experiments. Thus, the obtained data confirmed again that oxidative DNA damage towards purine bases plays

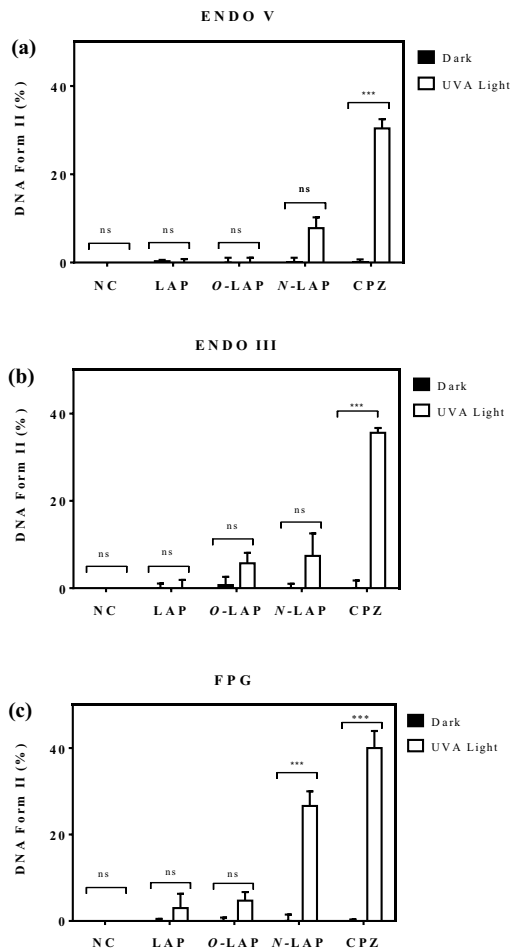


Fig. 4 Percentage of DNA Form II formation by means of restriction enzyme digestion [Endo V (**a**), Endo III (**b**) or FPG (**c**)] of pBR322 (250 ng) incubated with LAP or its metabolites (30 μ M) in the presence (empty square) or absence (filled with square) of UVA Light (15 J/cm²). Data are the mean $\pm$ SD of four independent experiments. The initial value of Form II was subtracted from all samples. Asterisks indicate significant differences relative to the formation of DNA Form II in darkness by the *t* Student test (ns: non-significant, ****p* < 0.001). CPZ was used as positive control of photogenotoxicity

a significant role in the photogenotoxicity exhibited by *N*-LAP metabolite.

Conclusion

In conclusion, the present work has proven that not only LAP, but also its metabolite *N*-LAP have the capability to induce photosensitivity disorders. They are both phototoxic and photogenotoxic to cells, as revealed by the 3T3 NRU assay and the comet assay, respectively. By contrast, the *O*-dealkylated metabolite *O*-LAP does not display relevant photobiological properties. Interestingly, the parent drug LAP shows the highest activity in membrane phototoxicity and protein oxidation, whereas *N*-LAP is associated with the highest photogenotoxicity, through oxidation of purine bases, as revealed by detection of 8-Oxo-dG. Overall, these results are relevant in connection with photosafety issues and highlight the role of drug metabolism in photobiological risk assessment. Moreover, from the clinical point of view it is important to identify the cutaneous adverse events associated with targeted therapies.

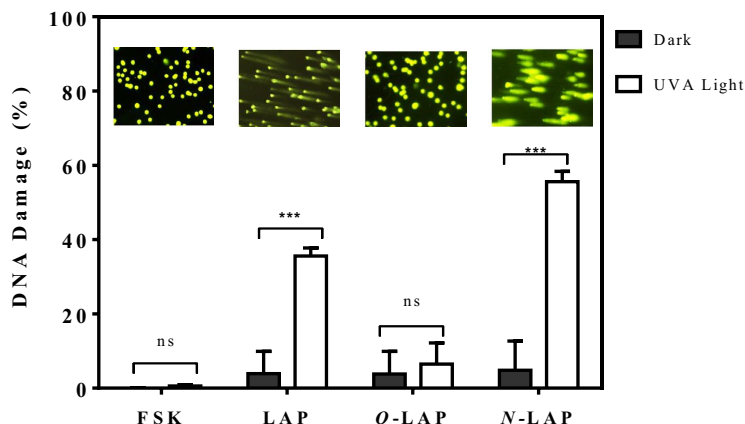


Fig. 5 Nuclear DNA photodamage promoted by LAP, N-LAP and O-LAP assessed by alkaline comet assay. Data are reported as the percentage of DNA damage calculated by visual scoring of untreated cells (FSK) or treated with LAP or its metabolites O-LAP and N-LAP (30 μM). Cells were kept on dark conditions (Dark, filled with square) or irradiated with a 2.5 J/cm² UVA dose (UVA Light, empty

square). Data represent the mean ± SD of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences by the *t* Student test (***) $p < 0.001$, ns: non-significant). Inset: representative microscopy images of irradiated non-treated cells or treated with LAP, O-LAP and N-LAP

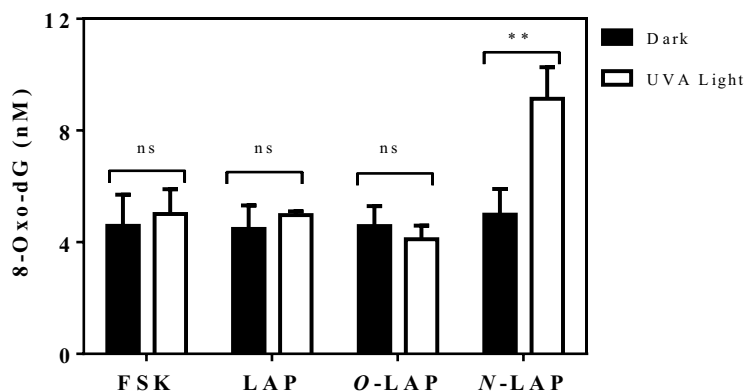


Fig. 6 Oxidation photodamage at purine base upon LAP and its metabolites treatment. 8-Oxo-dG formation in genomic DNA upon treatment with LAP or its metabolites (O-LAP and N-LAP) in FSK cells. Cells were incubated with LAP, O-LAP or N-LAP (30 μM) and left unexposed (Dark, filled with square), or irradiated with a 2.5 J/

cm² UVA dose (UVA Light, empty square). Then, DNA was isolated and the concentration of 8-Oxo-dG was quantified in all samples by means of a colorimetric ELISA assay. Data are the mean ± SD of three independent experiments. Asterisks denote significant differences by the *t* Student test (***) $p < 0.001$, ns: non-significant)

Acknowledgements This study was funded by the Carlos III Institute (ISCIII) of Health (Grants: PI16/01877, CPII16/00052, ARADyAL RD16/0006/0030) co-funded by European Regional Development Fund, the Spanish Government (RYC-2015-17737, CTQ2017-89416-R) and Generalitat Valenciana (Prometeo/2017/075). We would also like to thank IIS La Fe Microscopy Unit for technical assistance.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abo-Zeid MAM, Abo-Elfadl MT, Gamal-Eldeen AM (2019) Evaluation of lapatinib cytotoxicity and genotoxicity on MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Environ Toxicol Pharmacol* 71:103207. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103207>
- Agundez JAG, Garcia-Martin E, Garcia-Lainez G, Miranda MA, Andreu I (2020) Photomutagenicity of chlorpromazine and its *N*-demethylated metabolites assessed by NGS. *Sci Rep* 10(1):6879. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63651-y>
- Cadet J, Davies KJA (2017) Oxidative DNA damage and repair: an introduction. *Free Radic Biol Med* 107:2–12. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.030>
- Castellino S, O'Mara M, Koch K, Borts DJ, Bowers GD, MacLaughlin C (2012) Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: implications for hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos* 40(1):139–150. <https://doi.org/10.1124/dmd.111.040949>
- Ding J, Yao Y, Huang G et al (2020) Targeting the EphB4 receptor tyrosine kinase sensitizes HER2-positive breast cancer cells to Lapatinib. *Cancer Lett* 475:53–64. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.032>
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5):E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Frenel JS, Bourbouloux E, Berton-Rigaud D, Sadot-Lebouvier S, Zanetti A, Campone M (2009) Lapatinib in metastatic breast cancer. *Womens Health (Lond)* 5(6):603–612. <https://doi.org/10.2217/whe.09.54>
- Garcia-Lainez G, Martinez-Reig AM, Limones-Herrero D, Consuelo Jimenez M, Miranda MA, Andreu I (2018) Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol* 341:51–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.01.005>
- Gavilá J, De La Haba J, Bermejo B et al (2020) A retrospective, multicenter study of the efficacy of lapatinib plus trastuzumab in HER2-positive metastatic breast cancer patients previously treated with trastuzumab, lapatinib, or both: the Trastyvere study. *Clin Transl Oncol* 22(3):420–428. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02145-4>
- Geyer CE, Forster J, Lindquist D et al (2006) Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 355(26):2733–2743. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa064320>
- Gomez HL, Doval DC, Chavez MA et al (2008) Efficacy and safety of lapatinib as first-line therapy for ErbB2-amplified locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26(18):2999–3005. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.0590>
- Heppt MV, Clanner-Engelshofen BM, Marsela E et al (2020) Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 36(2):126–134. <https://doi.org/10.1111/phpp.12520>
- Higa GM, Abraham J (2007) Lapatinib in the treatment of breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 7(9):1183–1192. <https://doi.org/10.1586/14737140.7.9.1183>
- Huijberts S, van Geel R, van Brummelen EMJ et al (2020) Phase I study of lapatinib plus trametinib in patients with KRAS-mutant colorectal, non-small cell lung, and pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 85(5):917–930. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04066-4>
- Kabir MZ, Mukarram AK, Mohamad SB, Alias Z, Tayyab S (2016) Characterization of the binding of an anticancer drug, lapatinib to human serum albumin. *J Photochem Photobiol B* 160:229–239. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.005>
- Kopper L (2008) Lapatinib: a sword with two edges. *Pathol Oncol Res* 14(1):1–8. <https://doi.org/10.1007/s12253-008-9018-z>
- Macdonald JB, Macdonald B, Golitz LE, LoRusso P, Sekulic A (2015) Cutaneous adverse effects of targeted therapies: Part I: Inhibitors of the cellular membrane. *J Am Acad Dermatol* 72(2):203–218. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.07.032>
- Medina PJ, Goodin S (2008) Lapatinib: a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clin Ther* 30(8):1426–1447. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.08.008>
- Melhuish WH (1961) Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J Phys Chem* 65(2):229–235. <https://doi.org/10.1021/j100820a009>
- Mendelsohn J, Baselga J (2000) The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19(56):6550–6565. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204082>
- Moon JY, Han JM, Seo I, Gwak HS (2019) Risk factors associated with the incidence and time to onset of lapatinib-induced hepatotoxicity. *Breast Cancer Res Treat* 178(1):239–244. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05382-x>
- Nolting M, Schneider-Merck T, Trepel M (2014) Lapatinib. *Recent Results Cancer Res* 201:125–143. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54490-3_7
- OECD (2004) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. <https://doi.org/10.1787/20745788>
- Palumbo F, Garcia-Lainez G, Limones-Herrero D et al (2016) Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 313:131–137. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.10.024>
- Parham LR, Briley LP, Li L et al (2016) Comprehensive genome-wide evaluation of lapatinib-induced liver injury yields a single genetic signal centered on known risk allele HLA-DRB1*07:01. *Pharmacogenomics J* 16(2):180–185. <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.40>
- Rayane Mohamed FS, Sidibe J, Bararpour N, Desmeules J, Ausburger M, Daali Y, Thomas A (2018) Detection and identification of reactive drug metabolites leading to idiosyncratic toxicity: lapatinib as a case example. *J Drug Metab Toxicol* 9(3):1–6. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000242>
- Schroeder RL, Stevens CL, Sridhar J (2014) Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer. *Molecules* 19(9):15196–15212. <https://doi.org/10.3390/molecules190915196>
- Spector N, Xia W, El-Hariry I, Yarden Y, Bacus S (2007) HER2 therapy. Small molecule HER-2 tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Res* 9(2):205. <https://doi.org/10.1186/bcr1652>
- Spraggs CF, Budde LR, Briley LP et al (2011) HLA-DQA1*02:01 is a major risk factor for lapatinib-induced hepatotoxicity in women with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 29(6):667–673. <https://doi.org/10.1200/jco.2010.31.3197>
- Tokura Y, Ogai M, Yagi H, Takigawa M (1994) Afloqualone photosensitivity: immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem Photobiol* 60(3):262–267. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1994.tb05102.x>
- Towles JK, Clark RN, Wahlin MD, Uttamsingh V, Rettie AE, Jackson KD (2016) Cytochrome P450 3A4 and CYP3A5-catalyzed bioactivation of lapatinib. *Drug Metab Dispos* 44(10):1584–1597. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.070839>
- Wang H (2014) Lapatinib for the treatment of breast cancer in the People's Republic of China. *Oncotargets Ther* 7:1367–1373. <https://doi.org/10.2147/OTT.S60586>

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



Singlet oxygen and radical-mediated mechanisms in the oxidative cellular damage photosensitized by the protease inhibitor simeprevir

Guillermo Garcia-Lainez^{a,1}, Meryem El Ouardi^{b,c,1}, Alejandro Moreno^a, Emilio Lence^d, Concepción González-Bello^d, Miguel A. Miranda^{b,c,**}, Inmaculada Andreu^{b,c,*}

^a Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia, Spain

^b Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

^c Unidad Mixta de Investigación UPV- IIS La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, Avenida de Fernando Abril Martorell 106, 46026, Valencia, Spain

^d Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS), Departamento de Química Orgánica, Universidade de Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Antiviral agent
Binding to proteins
Cellular photo(geno)toxicity
Photodamage to biomolecules
Triplet excited state

ABSTRACT

Hepatitis C, a liver inflammation caused by the hepatitis C virus (HCV), is treated with antiviral drugs. In this context, simeprevir (SIM) is an NS3/4A protease inhibitor used in HCV genotypes 1 and 4. It is orally administered and achieves high virological cure rates. Among adverse reactions associated with SIM treatment, photosensitivity reactions have been reported. In the present work, it is clearly shown that SIM is markedly phototoxic, according to the *in vitro* NRU assay using BALB/c 3T3 mouse fibroblast. This result sheds light on the nature of the photosensitivity reactions induced by SIM in HCV patients, suggesting that porphyrin elevation in patients treated with SIM may not be the only mechanism responsible for SIM-associated photosensitivity. Moreover, lipid photoperoxidation and protein photooxidation assays, using human skin fibroblasts (FSK) and human serum albumin (HSA), respectively, reveal the capability of this drug to promote photodamage to cellular membranes. Also, DNA photo lesions induced by SIM are noticed through comet assay in FSK cells. Photochemical and photobiological studies on the mechanism of SIM-mediated photodamage to biomolecules indicate that the key transient species generated upon SIM irradiation is the triplet excited state. This species is efficiently quenched by oxygen giving rise to singlet oxygen, which is responsible for the oxidation of lipids and DNA (Type II mechanism). In the presence of HSA, the photobehavior is dominated by binding to site 3 of the protein, to give a stable SIM@HSA complex. Inside the complex, quenching of the triplet excited state is less efficient, which results in a longer triplet lifetime and in a decreased singlet oxygen formation. Hence, SIM-mediated photooxidation of the protein is better explained through a radical (Type I) mechanism.

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a health service problem of the first magnitude in Europe and especially in the Mediterranean countries, where prevalence rates are in the range 1–3% [1–3]. Moreover, hepatitis C can lead to liver cirrhosis and liver cancer, being a leading cause of liver transplantation [4].

Simeprevir (SIM) is an NS3/4A protease inhibitor for use in HCV genotypes 1 and 4. It is orally administered and achieves high virological

cure rates. Moreover, it has a favorable tolerability profile when used in combination with peginterferon-alfa plus ribavirin or with sofosbuvir [5–8].

Recently, it has been reported that SIM is an especially promising drug for treating COVID-19 because it potentially reduces SARS-CoV-2 viral load by multiple orders of magnitude [9,10]. In this context, the viral protease inhibitors nelfinavir and simeprevir revealed good plasma exposures and based on their described mode of action, they may inhibit SARS-CoV-2 directly [11]. Therefore, SIM could prevent coronavirus

* Corresponding author. Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

** Corresponding author. Departamento de Química-Instituto de Tecnología Química UPV-CSIC. Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

E-mail addresses: mmiranda@qim.upv.es (M.A. Miranda), iandreu@qim.upv.es (I. Andreu).

¹ These authors equally contributed to the work.

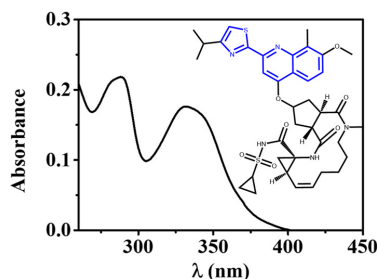


Fig. 1. Absorption spectrum of SIM in PBS. Inset: Chemical structure of SIM.

from replicating and might help in Covid-19 treatment.

The most commonly occurring adverse events associated with SIM treatment are rash, itching, sun sensitivity, muscle pain, shortness of breath, and nausea [5,12–14]. In particular, photosensitivity reactions have been reported in phase III studies [15]. Moreover, dermatological side-effects could be a problem in the management of SIM administration, and pharmacokinetic analysis is a valuable tool in a “real-life” clinical setting. In a previous study, it has been evaluated a possible relationship between plasma levels and the onset of skin complaints. With regard to this, SIM plasma concentrations were significantly related to dermatological side effects at early time points and the best predictive factor for skin symptoms was simeprevir concentrations at one week. Photosensitive condition (grade-1 sunburn) was found after the first month [16].

In this context, SIM is associated with phototoxicity, but there is no clear evidence for an increased risk of keratinocyte carcinoma [17]. Thus, SIM would act as a light-activated photosensitizer triggering a cascade of chemical events that may finally result in important biological disorders. This damage would occur by direct modification of biomolecules (isomerization, bond breaking, oxidation, etc.) or through the involvement of free radical intermediates, including singlet oxygen. As a result, cell constituents such as unsaturated lipids, proteins, or bases of nucleic acids can be altered. In this situation, if the repair mechanisms are not efficient, there can be irreversible lesions.

Given the above, a better understanding of the photodermatologic adverse reactions of SIM, based on a thorough photochemical and photobiological mechanistic study is necessary.

With this background, the aim of the present work is to investigate the direct photodamage to cells induced by SIM itself, using a methodology previously set up in our group to study photosensitivity reactions [18–21]. This makes sense since SIM displays a significant absorption band in the UVA region, which is an active fraction of solar light able to produce photosensitivity disorders. As shown in Fig. 1, the spectrum has two maxima centered at 288 nm and 332 nm that correspond to the thiazole-quinoline chromophore (Fig. 1). After light absorption by SIM, highly reactive intermediates could be formed including organic radicals and reactive oxygen species (ROS). Short-lived transients of these types could be in the origin of the clinically observed photosensitivity reactions.

2. Material and methods

2.1. General

Experimental descriptions such as chemicals and reagents, irradiation equipment, spectroscopic measurements, cell culture conditions, data analysis and statistics are provided in the supplementary material.

2.2. Laser flash photolysis

Laser flash photolysis (LFP) measurements were performed using a

pulsed Nd:YAG L52137 V LOTIS TII laser at 355 nm as the excitation wavelength (Sp Lotis Tii, Minsk, Belarus). The LFP equipment consisted of a pulsed laser, a 77 250 Oriel monochromator, and an oscilloscope DP04054 Tektronix. The single pulses were ~10 ns of duration, and the energy was ~12 mJ/pulse. For processing, the output signal from the oscilloscope was transferred to a personal computer. The measurements were recorded under aerated atmosphere, or in the case of triplet excited state decays, the solutions were deaerated by bubbling nitrogen (15 min). The absorbance of the samples was adjusted at ~0.30 at 355 nm and the rate constant of triplet excited state quenching by oxygen (k_q) was determined using the Stern–Volmer equation (eq. (1)).

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q [\text{O}_2] \quad \text{eq.1}$$

Where τ and τ_0 are the lifetime of transient species with and without quencher (O_2), respectively.

For the rate constant of triplet excited state quenching by 2-methyl-cyclohexa-2,5-dienecarboxyl acid (MBA), the following Stern–Volmer equation (eq. (2)) was used:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_q} + k_q [\text{MBA}] \quad \text{eq.2}$$

Where τ and τ_q are the lifetime of transient species in the presence and absence of MBA, respectively. Concentrations between 0.1 and 3 mM were used for MBA.

The rate constant of triplet excited state quenching by lapatinib (LAP) was calculated using the next Stern–Volmer equation (eq. (3)):

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_q} + k_q [\text{LAP}] \quad \text{eq.3}$$

Where τ and τ_q are the lifetime of transient species in the presence and absence of LAP, respectively. Concentrations up to 3 mM were used for the quencher.

Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$, $^1\Delta_g$) species was detected by NIR emission upon excitation with the Nd:YAG L52137 V LOTIS TII laser at 355 nm in aerated atmosphere. The absorbance of samples was adjusted at ~0.55 at 355 nm and decay traces were recorded at 1274 nm. Tetramethyl-*p*-benzoquinone (DQ) was used as a standard with a $^1\text{O}_2$ quantum yield (Φ_Δ) in MeCN, ca. 0.89 [22]. The Φ_Δ of SIM was calculated following equation (4).

$$\Phi_\Delta^{\text{SIM}} = \Phi_\Delta^{\text{DQ}} \times \frac{A_{\text{SIM}}}{A_{\text{DQ}}} \times \frac{I_{\text{MeCN}}}{I_i} \quad \text{eq.4}$$

Where Φ_Δ^{DQ} is the quantum yield of the standard (DQ), A_{SIM} and A_{DQ} are the absorbances of SIM and DQ, I_{MeCN} and I_i the refractive index of acetonitrile and the sample solvent, respectively.

All transient absorption experiments were performed in PBS, MeOH or MeCN at room temperature.

2.3. *In vitro* 3T3 neutral red uptake (NRU) phototoxicity test

The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity assay was basically performed according to the OECD Guideline 432 [23] as described in García-Lainez et al. [19]. As positive and negative control were selected chlorpromazine (CPZ) and sodium dodecyl sulphate (SDS), respectively. In brief, two 96-well plates were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/well. Then, serial dilutions of the drug ranging from 100 μM to 0.25 μM were added to each plate. After 1 h incubation at 37 °C in dark conditions, one plate was irradiated with a non-cytotoxic UVA light dose of 5 J/cm² whereas the other one was kept in the dark. Once UVA irradiation finished, culture medium was replaced, and plates were incubated overnight. Next day, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ neutral red solution was added into each well and incubated for 2 h at 37 °C. Cells were then washed once with PBS. In order to extract neutral red from lysosomes, 100 μL of desorption

solution (50% distilled water, 49.5% absolute ethanol and 0.5% acetic acid) was added per well. Absorbance was measured at 550 nm on a Synergy H1 microplate reader. Dose-response curves were established for each compound to determine the concentration producing a 50% decrease in the neutral red uptake (IC50) in dark and UVA light conditions by non-linear regression methods using the Graph Pad 5.0 software. Finally, photorritant factor (PIF) values were calculated according to equation (5).

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC50 DARK}}{\text{IC50 UVA LIGHT}} \quad \text{eq.5}$$

As stated in the OECD Guideline 432, a compound is labeled as “non-phototoxic” when $\text{PIF} = < 2$, “probably phototoxic” if PIF is between 2 and 5 and “phototoxic” if $\text{PIF} > 5$.

2.4. Photoinduced lipid peroxidation assay

The compound 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid, also known as C11-Bodipy 581/591 is a molecular probe to assess lipid peroxidation in living cells that shifts its fluorescence from red to green when the molecule is oxidized [24,25]. To this end, human skin fibroblast cells (FSK) were seeded in two 12-well-plates at a density of 6.0×10^4 cells/well. Next day, the cells were treated with 5 μM of SIM solutions and incubated for 30 min in dark conditions. After incubation, one plate was irradiated (2.5 J/cm²) and the other one was kept in dark conditions as negative control. Cells were labeled with the lipid peroxidation sensor C11 Bodipy 581/591 (10 μM) for 30 min at 37 °C. Finally, the cultures were visualized using a Leica DMI 4000B fluorescence microscope in sequential mode to detect both the non-oxidized (red fluorescence, λ_{exc} 535 nm) and the oxidized (green fluorescence, λ_{exc} 490 nm) forms of the probe. To determine the extent of lipid peroxidation in each condition, the fluorescence intensity ratio (FIR) was calculated following equation (6) using the Image-J software image analyzer (NIH).

$$\text{FIR} = \frac{\text{I red fluorescence}}{\text{I green fluorescence}} \quad \text{eq.6}$$

2.5. Protein photooxidation assay

Protein oxidation photoinduced by SIM, using human serum albumin (HSA) as model, was evaluated as previously described [26] with minor modifications. In brief, HSA solutions in PBS were prepared (5 mg/mL, 1 mg/sample) and incubated with increasing concentrations of SIM (1 μM , 2.5 μM and 5 μM) at room temperature for 1 h. Then, mixtures were irradiated with a UVA dose of 10 J/cm² or maintained in dark conditions as control of the assay. Immediately after irradiation, the extent of HSA oxidation was measured in all experimental conditions spectrophotometrically by derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). Thus, 200 μL of DNPH (10 mM) was added and incubated at room temperature for 1 h to form stable dinitrophenyl hydrazone adducts. Proteins were then precipitated with a 20% (v/v) trichloroacetic (TCA) solution and incubated on ice for 15 min. Afterwards, pellets were washed twice with ethanol/ethyl acetate 1:1 (v/v) containing 20% TCA to remove the unbound DNPH and dried at 60 °C. The adducts were resolubilized in 100 μL of 6 M guanidine-hydrochloride at 4 °C by overnight incubation. Finally, absorbance at 375 nm was recorded using the Synergy H1 microplate reader and the HSA oxidation degree was expressed as nmol of carbonyl moiety per mg protein.

2.6. Assessment of DNA photodamage

2.6.1. Plasmid DNA photosensitized damage

Samples containing 250 ng of supercoiled circular DNA (pBR322, 4361 base pairs) in the presence or absence of SIM (100 μM) in PBS supplemented with 1 mg/mL HSA were prepared. Mixtures were

irradiated as described above using a UVA light dose of 15 J/cm² (30 min). Immediately, loading buffer (0.25% bromophenol blue and 30% glycerol, in water) was added to each sample. Moreover, to characterize chemical modifications towards DNA bases promoted by the drug, samples were digested after irradiation with an excess of Endo V, Endo III or FPG (0.5 U) at 37 °C for 1 h and then, loading buffer was added as detailed above. Afterwards, all samples were loaded on a 0.8% agarose gel containing SYBR® Safe as nucleic acid stain. Electrophoresis run was carried out in TAE Buffer (0.04 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) at 100 V for 2 h. DNA bands were visualized with the Gel Logic 200 Imaging System (Kodak) and densitometry was quantified with the Image-J software. Thus, the relative percentage of the nicked relaxed form (Form II) of the pBR322 plasmid was calculated for each condition.

2.6.2. 8-Oxo-dG quantitation assay as a biomarker of oxidative DNA damage

FSK cells were seeded in two 24-well plates at a density of 7.5×10^5 cells/well. Next day, they were treated with 2.5 μM SIM solutions for 30 min at 4 °C in dark conditions. After incubation, one plate was irradiated (2.5 J/cm²) and the other one was kept in darkness. Afterwards, cells were harvested from the plates and then genomic DNA extraction was performed in all samples according to the manufacturer's protocol. DNA samples were quantified using a Nanodrop 2000c (Thermo Scientific). Later, samples containing 2 μg DNA (100 ng/mL) were digested with DNase I (1 U) at 37 °C for 1 h, followed by alkaline phosphatase incubation (1 U) at 37 °C for 1 h. Lastly, 8-oxo-dG concentration was determined in all samples by a competitive Elisa assay following the manufacturer's instructions. Data were expressed in nanomoles of 8-oxo-dG formed by interpolating the sample concentrations from the standard curve.

2.6.3. Nuclear DNA photodamage by comet assay

Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) was carried out as previously described [20] in order to detect strand breaks and alkaline labile sites on nuclear DNA. Briefly, FSK cells were trypsinized, resuspended in cold PBS and allowed to stand for 2 h at 4 °C for repairing the damage generated after detachment with trypsin. Then, two 24-well plates were seeded at a density of 1.0×10^5 cells/well and treated with 2.5 μM SIM solution for 30 min at 4 °C in dark conditions. In this assay, CPZ (10 μM) was selected as the photogenotoxic reference compound. After incubation, one plate was placed in the photoreactor to irradiate the cells (2.5 J/cm²) and the other one was kept in dark conditions as negative control. Immediately, irradiated and non-irradiated cells were harvested from the plates. Then, 100 μL of each sample was homogenized with 100 μL of 1% low melting point agarose solution and mixtures were placed forming drops (2.0×10^4 cell/gel) onto Trevigen® treated slides, allowing their jellification. Next, slides were immediately immersed in a container filled with lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 0.01 M Tris, 1% Triton X-100) and incubated overnight at 4 °C. In DNA recovery experiments to promote intrinsic cellular DNA-repair mechanisms, slides were maintained in DMEM medium at 37 °C for 20 h, and then lysed as stated above. Next day, all slides were transferred to a Trevigen® comet assay electrophoresis tank and covered with cold alkaline buffer (0.2 M NaOH, 1 mM EDTA, pH $\geq$ 13) and let during 40 min for DNA unwinding at 4 °C. Afterwards, the electrophoresis was carried out at 21 V (1 V/cm) for 30 min at 4 °C. Once the electrophoresis finished, the slides were washed twice in PBS for 5 min. DNA was fixed by two subsequent incubations with 70% and 100% ethanol solutions. Then, DNA was stained with SYBR Gold® (1:10.000 dilution in TE buffer – Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM) for 30 min at 4 °C in darkness. Finally, the slides were air-dried and kept in dark conditions. Comet nucleoids and tails were visualized using a Leica DMI 4000B fluorescence microscope (λ_{exc} 490 nm). At least 100 cells/sample were analyzed to determine DNA damage. The percentage of DNA damage of each sample was calculated with the visual scoring of at least 100 DNA comets using the subsequent formula [27]: [(Nclass 0 comets

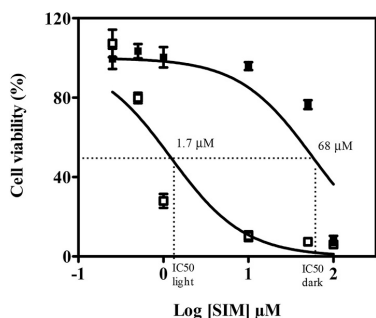


Fig. 2. 3T3 NRU phototoxicity assay. Dose-response curves for cell viability of BALB/c 3T3 mouse fibroblast cells treated with SIM in Dark (■) and UVA light conditions (5 J/cm², □). Data are the mean $\pm$ SD from four independent experiments.

$\times 0) + (\text{Nclass 1 comets} \times 1) + (\text{Nclass 2 comets} \times 2) + (\text{Nclass 3 comets} \times 3) + [(\text{Nclass 4 comets} \times 4) + (\text{Nclass 5 comets} \times 5) + (\text{Nclass 6 comets} \times 6)]/6$, where class 0 comets indicate comets with no DNA damage and class 6 comets indicate comets with maximum DNA damage.

2.7. Molecular docking

These studies were carried out using our previously reported protocol for lapatinib against HSA [28,29]. The protein coordinates obtained in the crystal structure of HSA in complex with hemin and myristic acid (PDB entry 1O9X) [30] and the docking program GOLD version 2020.2.0 [31] were used.

2.8. Molecular dynamics simulation studies

The highest score solution obtained by docking was subjected to 100

ns of dynamic simulation, which was performed as previously described by us for trifusal [32]. The cpptraj module in AMBER 17 was used to analyze the trajectories and to calculate the rmsd of the protein and the ligand during the simulation [33]. The molecular graphics program PyMOL (DeLano) was employed for visualization and depicting enzyme structures.

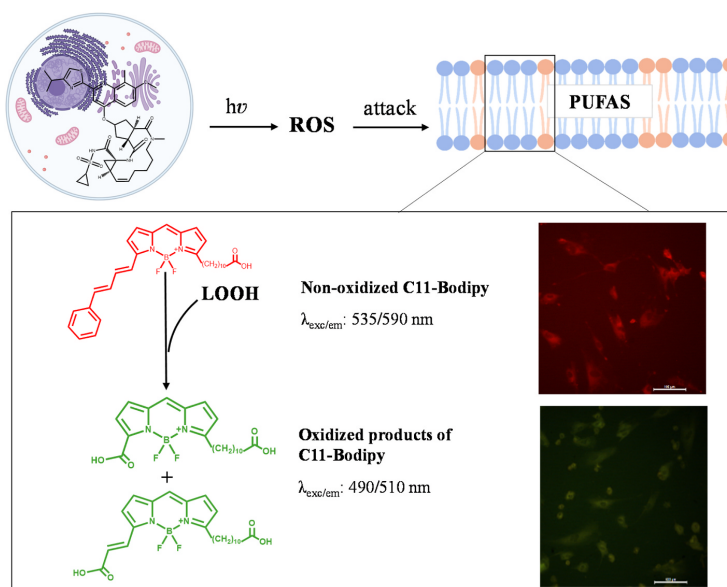
3. Results and discussion

3.1. Phototoxicity of simeprevir

Sunlight activated drug can trigger a cascade of chemical events that finally result in important biological disorders including phototoxicity. This process can be evaluated through *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test following the OECD Guideline 432 [23].

3.1.1. *In vitro* 3T3 neutral red uptake (NRU) phototoxicity assay

Assessment of the phototoxicity of simeprevir (SIM) was performed according to the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test [23]. To achieve this goal, BALB/c 3T3 mouse fibroblast cells were treated with increasing concentrations of SIM and cell viability was analyzed by neutral red as vital stain. From dose-response curves, half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) under dark or UVA light conditions were estimated. As shown in Fig. 2, SIM displayed a cytotoxic profile in dark conditions with an IC₅₀ in the micromolar range (68 μM). It is noteworthy that its toxicity was enhanced in combination with UVA light (IC₅₀ = 1.7 μM). Consequently, phototoxicity was determined by the calculation of the photorritant factor value (PIF), defined as the ratio between the IC₅₀ under dark and light conditions. The PIF obtained was around 40, which is 8-fold higher than the cut-off value for a phototoxic compound as stated by the OECD guide [23]. Remarkably, this result sheds light on the nature of the photosensitivity reactions induced by SIM in HCV patients. So, it confirms that porphyrin elevation in patients treated with SIM may not be the only mechanism responsible for SIM-associated photosensitivity. Thus, phototoxic mechanisms usually comprise the generation of cellular oxidative stress that promotes damage to biomolecules such as lipids, proteins and DNA, leading ultimately to cell



Scheme 1. Lipid photoperoxidation detection in human skin fibroblast cells (FSK) by C11-BODIPY (581/591) probe.

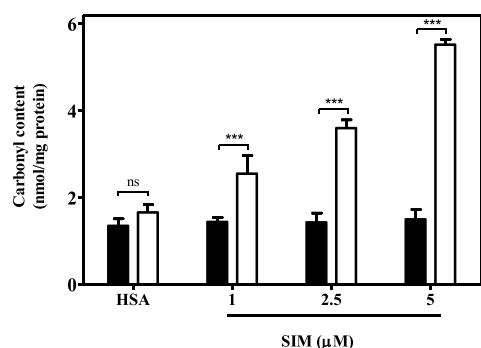


Fig. 3. Protein photooxidation promoted by SIM in human serum albumin (HSA) model. HSA was irradiated (10 J/cm^2) in the presence of SIM and the carbonyl content was evaluated spectrophotometrically by monitoring its carbonyl moiety after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine ($\lambda = 375 \text{ nm}$). Non-irradiated solutions were analyzed as control (■). Data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Asterisks show significant differences by the Student's *t*-test compared to dark conditions (****p* < 0.001, ns: non-significant).

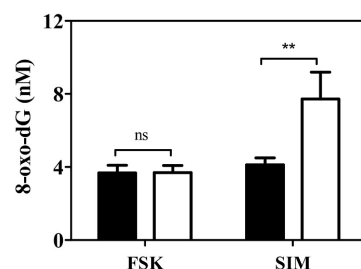
death [34].

3.1.2. Lipid and protein photooxidation

As SIM displays highly lipophilic properties, membrane components (lipids and proteins) could be the targets for its phototoxicity. To confirm this hypothesis, first, lipid photoperoxidation was investigated using the fluorescent reporter C11-Bodipy 581/591, which consists of a boron dipyrromethene difluoride core attached to a fatty acid tail and a phenyl moiety connected by a diene bond (Scheme 1). This assay is based on the capability of this molecular probe to penetrate the plasmatic membrane and to shift the fluorescence emission upon its oxidation from red ($\lambda_{\text{exc}} 535 \text{ nm}$), which corresponds to the native structure of the probe, to green ($\lambda_{\text{exc}} 490 \text{ nm}$), attributed to its oxidation products. As it is described in the literature, the Bodipy is exclusively sensitive to free radical species generated from hydroperoxides, but not to hydroperoxides *per se* [35,36]. With this aim, FSK cells were treated with SIM (5 μM) and subsequently irradiated (2.5 J/cm^2) or maintained in darkness as control. Then, cells were stained with the C11-Bodipy 581/591 after irradiation to rule out direct photochemical reactions between the drug and the probe, and finally, they were visualized under the fluorescent microscope. The images shown in Scheme 1 and Fig. S1 revealed an increase in the green fluorescence intensity (oxidized product) in UVA light conditions in comparison with non-irradiated treated cells, indicating a high degree of lipid peroxidation. By contrast, lipid peroxidation in non-treated cells was negligible. Accordingly, the quantitative analysis showed a significant reduction of the red to green fluorescence intensity ratio (Fig. S1). These results support that lipid membrane is indeed a potential target for SIM phototoxicity.

Moreover, protein photooxidation was investigated using the human serum albumin (HSA) as protein model. Thus, solutions of HSA containing SIM were UVA irradiated with a dose of 10 J/cm^2 and afterwards, the carbonyl moiety, as a biomarker of protein oxidation, was quantified by the derivatization method using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). According to Fig. 3, irradiated HSA without treatment showed similar concentration of carbonyl moiety as non-irradiated HSA, indicating the suitability of the dose selected. Interestingly, for SIM, a dose-dependent enhancement of the carbonyl content of HSA was observed after irradiation in comparison with non-irradiated mixtures, reaching ca. 3-fold increase at 5 μM . This assay confirmed the capability

A



B

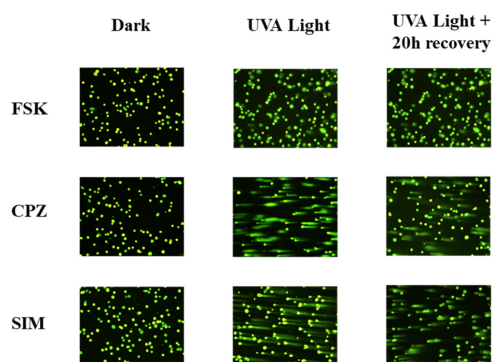


Fig. 4. Cellular photogenotoxicity. (A) 8-oxo-dG formation in human skin fibroblasts cells (FSK) upon SIM treatment. FSK cells alone (FSK) or treated with SIM (2.5 μM) were kept in Dark (■) or irradiated with a 2.5 J/cm^2 UVA dose (□). Then, genomic DNA was isolated and the oxidative biomarker 8-oxo-dG was quantified by means of colorimetric antibody Elisa assay. Asterisks indicate significant differences relative to the FSK cells in dark conditions by the Student's *t*-test (***p* < 0.01; ns: non-significant). (B) Fluorescence microscopy images of SIM alkaline comet assay experiments. FSK cells alone (FSK) or treated with SIM (2.5 μM) or CPZ (10 μM) as the reference photogenotoxic compound were kept on dark conditions (Dark), irradiated with 2.5 J/cm^2 UVA dose (UVA Light) or irradiated with 2.5 J/cm^2 UVA dose followed by 20 h of cell recover (UVA Light + 20 h recovery time). Images are representative of three independent experiments.

of SIM to promote photooxidation in cellular membranes. According to our previous work on photosensitizing drugs [20,37], this type of HSA modification could involve a type I (radicals) or type II (singlet oxygen) photooxidation of the redox-active amino acid residues.

3.1.3. Photogenotoxicity

In order to evaluate whether DNA, another biomolecule target of oxidative damage, could also be involved in the SIM phototoxicity mechanism, a screening was performed using plasmid DNA alone or in combination with different repair enzymes (Endo V, Endo III and FPG). Actually, the electrophoresis agarose gel shown in Fig. S2 highlighted that SIM can indeed promote DNA photodamage mainly through purine base oxidation, as revealed using the FPG repair enzyme. Among all the oxidatively generated lesions into the cellular DNA by UVA light, one of the most frequent is the guanine residue oxidation at C8 to generate 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) [38]. This lesion can result highly mutagenic if it is not efficiently repaired, since this

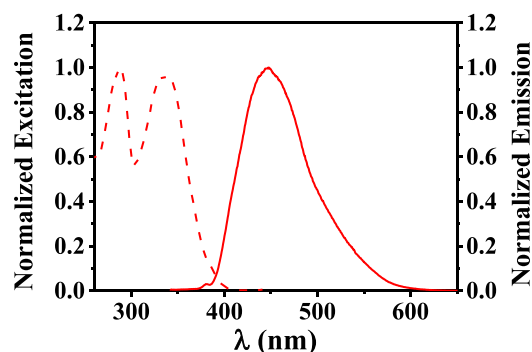


Fig. 5. Normalized fluorescence emission spectrum recorded at $\lambda_{\text{exc}} = 332$ nm (solid red) and normalized fluorescence excitation spectrum registered at $\lambda_{\text{max}} = 447$ nm (dashed red) of SIM in PBS solution. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

modified base can pair in the double helix not only with cytosine but also with adenine. Having established the ability of SIM to induce purine oxidation in a cell-free system, in a further step, this process was also assessed in a cellular environment. Hence, the photogeneration of this biomarker in FSK cells DNA by SIM was studied. To achieve this goal, FSK were incubated with SIM and then, exposed to a UVA dose of 2.5 J/cm². After irradiation, genomic DNA was isolated and quantified by UV spectroscopy ($\lambda = 260$ nm). Then, a competitive Elisa assay was carried out to detect the presence of 8-oxo-dG in samples. Thus, as shown in

a visual score system of 6 different categories [27]. Moreover, chlorpromazine (CPZ), a well-known drug with photogenotoxic properties was used as positive control [18]. The results shown in Fig. 4B and Fig. S3 indicated that SIM generated significant DNA damage to cellular DNA (around 40%), to a lesser extent than CPZ. Additionally, another set of experiments were performed to investigate the capability of FSK cells to repair that DNA photodamage generated. For this purpose, cells upon treatment were incubated for different time periods up to 20 h and the remaining DNA damage was determined in the same way described above. As shown in Fig. 4B, in contrast to CPZ, it is noteworthy that photosensitized DNA was not repaired within 20 h of recovery. This is in agreement with the possibility of SIM to generate mutations in the DNA and ultimately, these could lead to photocarcinogenesis.

3.2. Photophysical studies

Drug photosensitizing potential can be associated with damage to biomolecules involving ROS or radicals arising from excited states [40]. Here, in order to gain insight into the phototoxicity of SIM, in a further step, photophysical studies combining fluorescence, transient absorption and time-resolved near-infrared luminescence spectroscopy were carried out.

3.2.1. Emission spectra

The steady-state fluorescence spectrum of SIM in PBS solution showed a maximum centered at $\lambda_{\text{max}} = 447$ nm (Fig. 5). The SIM fluorescence quantum yield (Φ_F) was determined using anthracene in ethanol as standard ($\Phi_F = 0.27$) and it resulted to be ca. 0.05 [41] (Fig. S4). Similar results were obtained using MeCN and MeOH, as model solvent, mimicking lipophilic environment present in the cellular milieu (Table S1). In addition, singlet excited state energy (E_s) was calculated from the intersection between the normalized excitation and

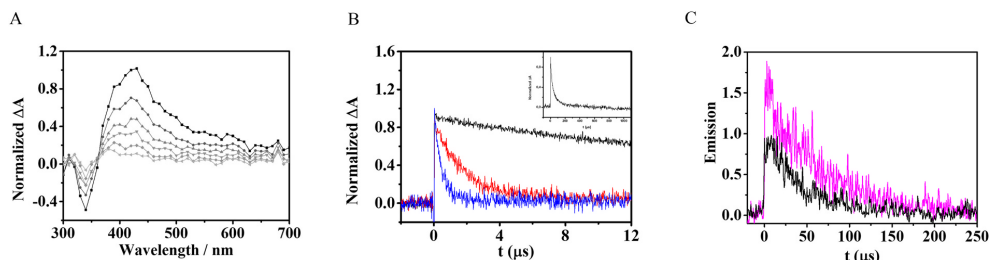


Fig. 6. Laser Flash Photolysis experiments. (A) Normalized transient absorption spectra (from 1 to 14 μ s) for simeprevir in aerated PBS solution after the 355 nm laser excitation. (B) Normalized decay traces of the triplet generated in PBS solution of SIM monitored at 410 nm in deaerated (black), aerated (red) and oxygen saturated atmosphere (blue). Inset: normalized decay trace of SIM in deaerated PBS solution on a longer time-scale. (C) Kinetic traces for $^1\text{O}_2$ signals after laser pulse ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm) for SIM in deuterated water (black). Tetramethyl-*p*-benzoquinone (DQ) in MeCN (magenta) was the reference of the study (Φ_{Δ} ca. 0.89). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Fig. 4A, the 8-oxo-dG in SIM-treated cells was found to be twice higher than in non-treated cells. This agrees with the important role of guanine base oxidation in the photogenotoxicity of SIM.

In an attempt to describe in detail other types of DNA photolesions induced by SIM, comet assay experiments were subsequently carried out. This assay identifies combined DNA damage consisting of single-strand breaks, double-strand breaks, and alkali-labile sites on individual cells [39]. In this assay, after treatment with the drug and UVA irradiation, FSK cells were embedded in agarose mini-gels on slides and subjected to lysis. Afterwards, electrophoresis was run to allow damaged DNA fragments migrating out of the cell nucleus, forming a comet tail. Upon SYBR® Gold staining, comets and tail were examined under the fluorescence microscope and nuclear DNA damage was calculated using

emission spectra (Fig. 5) and it was found to be 73.3 kcal/mol.

3.2.2. Laser flash photolysis

To detect reactive species generated by the excitation of SIM living in the microsecond time-scale, laser flash photolysis (LFP) technique was employed. Thus, upon excitation of the drug at 355 nm in aerated PBS solution, the transient absorption spectrum exhibited a band with a maximum centered at 410 nm (Fig. 6A). In addition, from decay traces analysis at 410 nm it was determined the lifetime (τ_T) that was ca. 44 μ s (Fig. 6B), and the triplet energy (E_T) obtained from phosphorescence measurements was approximately 59.6 kcal/mol (Fig. S5). Moreover, to characterize this transient species, oxygen quenching experiments were carried out in PBS solutions of the drug. As shown in Fig. 6B, this

species was efficiently quenched by molecular oxygen with a quenching rate constant (k_q) of $1.71 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ calculated by a mono-exponential decay function (Fig. S6). This indicates that the transient species peaking at 400 nm corresponds to a triplet excited state. For MeOH and MeCN solvents, comparable results were obtained (Fig. S7 and Table S1). Significant triplet production is indicative of potential photobiological damage since this excited state has a biradical character and is the precursor of the reactive species, including free radicals and ROS.

It is well known that a drug triplet excited state is usually regarded as the key precursor that sensitizes molecular singlet oxygen ($^1\text{O}_2$ or $^1\Delta_g$) formation through an electronic energy transfer process in Type II oxidative mechanism reactions [42]. Furthermore, $^1\text{O}_2$ can promote extensive oxidative damage to biomolecules inside cells, including lipid peroxidation through hydroperoxide formation [24,25], protein oxidation [43], and DNA nucleosides (such as guanine) oxidation to obtain the final oxidized base (8-oxo-dG) [44]. Bearing in mind from cellular experiments that SIM promoted lipid photoperoxidation, protein photooxidation and 8-oxo-dG formation in DNA, the photogeneration of $^1\text{O}_2$ by this drug should be expected. To confirm this hypothesis, it is interesting to perform time-resolved near-infrared emission studies upon 355 nm excitation of SIM. Thus, formation of this species was detected by time-resolved measurements of the luminescence at 1270 nm in deuterated aqueous solution (Fig. 6C). To determine the SIM singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ), tetramethyl-*p*-benzoquinone (DQ), was employed as reference (Φ_Δ ca. 0.89 in MeCN) [22]. As expected, SIM displayed ability to generate $^1\text{O}_2$ with a $\Phi_\Delta = 0.56$. The SIM Φ_Δ in organic solvents was also measured and they were found to be ca. 0.82 and 1 for MeOH and MeCN, respectively (Fig. S8 and Table S1). As regards the singlet oxygen lifetime (τ_Δ) in deuterated aqueous solution, it was measured using DQ as standard and was 65 μs . Likewise, the lifetime obtained for SIM was ca. 40 μs (Fig. 6C).

3.3. Molecular basis of simeprevir interaction with biomolecules

The photophysical studies of SIM are in good agreement with the cellular photodamage pointed out for this drug. This could be the origin of the oxidative stress to biomolecules, thus leading to undesired effects of phototoxicity and photogenotoxicity. Therefore, in view of the capability of SIM to form triplet excited species, it was considered convenient to perform additional experiments regarding SIM interaction with biomolecules, such as lipids, proteins and DNA. Thus, drug-lipid interaction studies were carried out by quenching experiments using 2-methylcyclohexa-2,5-dienecarboxylic acid (MBA) as a lipid model, which contains double allylic hydrogens and is an appropriate probe for studying the reactivity of lipids with photosensitizing drugs [43]. As a result, triplet decay traces were obtained in deaerated acetonitrile solutions of SIM after the addition of increasing amounts of MBA. As shown in Fig. 7, the SIM triplet species was quenched by MBA with a k_q of only $1.68 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7, inset). Moreover, SIM-HSA (1:1) interaction did indeed occur, and the complex displayed a higher triplet lifetime ($\tau_T = 17 \mu\text{s}$) than the free drug in solution ($\tau_T = 1.7 \mu\text{s}$) under aerated atmosphere (Fig. S9 and Table S2). By contrast, τ_T of SIM in the presence of calf thymus DNA (ctDNA) remained unchanged; hence the complexation of SIM with DNA was not supported experimentally (Fig. S9 and Table S2).

Overall, the above data indicate that triplet quenching by oxygen, leading to singlet oxygen, is the predominating process in the presence of lipids and DNA; hence, photosensitized oxidation of these biomolecules occurs by a Type II mechanism. Conversely, in the presence of protein a complex is formed where the triplet state is protected from quenching by oxygen, and the formation of singlet oxygen is much less efficient (Table S2). Accordingly, under these conditions, oxidation of the proteins must proceed via a Type I mechanism. In view of the importance of SIM complexation to proteins, a detailed docking and molecular dynamics simulation study was performed on the binding

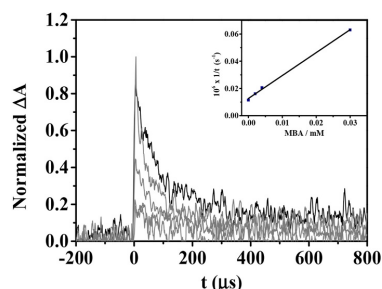


Fig. 7. Triplet decays at 410 nm for SIM alone (black) or in the presence of increasing amount of MBA (0–3 mM) (gray). Inset: Stern-Volmer plot for $^3\text{SIM}^*$ quenching by MBA.

process.

3.3.1. Binding of simeprevir to human serum albumin

To understand the underlying molecular basis of the interaction of SIM with the HSA protein, as well as its photophysical properties experimentally observed upon binding, docking and molecular dynamics (MD) simulation studies were performed.

In this context, HSA is a carrier protein with a large capacity for transporting a wide variety of endo and exogenous ligands structurally very diverse. It has three main recognition binding sites, namely domains I–III, each one divided into two sub-domains A and B, with a very different recognition pattern. Hence our first efforts were directed at identifying the SIM recognition domain of HSA, which was achieved by competition studies using three compounds whose protein binding sites are known, specifically ibuprofen (IBP) (site 1, sub-domain IIA), warfarin (WAF) (site 2, sub-domain IIIA) and lapatinib (LAP) (site 3, sub-domain IB) [45,33]. Thus, increasing amounts of the ligand were added to aerated solutions of $10 \mu\text{M}$ SIM-HSA (1:1), and transient decays were monitored at 410 nm. Under these conditions, a decrease of the transient species lifetime was only observed in parallel with the addition of LAP concomitantly with an increase of the free SIM fraction (k_q of ca. $5.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), ergo, this can be correlated with the complexation of SIM to the binding site 3 of HSA (Fig. 8A and Fig. S10). Thus, to determine the binding constant of SIM to HSA, the decays monitored at 410 nm were fitted using a two-phase exponential function. Then, using the preexponential factors values, both the percentage of free and bound SIM were calculated (Fig. S10). The half-maximal effective concentration (EC50) for lapatinib was obtained by interpolation from competition displacement curve and it resulted to be $7 \mu\text{M}$ (Fig. 8B). Moreover, the binding constant of lapatinib to HSA (K_B) was taken from the literature and it was $1.24 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (at 303 K) [46]. As the SIM concentration used was $10 \mu\text{M}$, the relationship between the binding constants was found to be 0.7 and therefore the K_B of SIM resulted to be $0.87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Based on the results obtained with the afore-mentioned competition studies, through which site 3 (sub-domain IB) was identified as the SIM binding pocket, the three-dimensional structure of HSA in complex with myristic acid and hemin (PDB ID 1O9X) was selected for docking. Among the variety of HSA crystal structures available, this PDB was chosen because hemin, as well as LAP, binds to sub-domain IB. It is important to note that this protein undergoes significant conformational changes, especially in domains I and III, both located at the vertices of its general V-shaped structure, to maximize its interaction with ligands [47]. Hence, choosing a PDB with a ligand already arranged in the same pocket becomes relevant for achieving optimal docking results. In addition, performing MD simulation studies on the proposed ligand@HSA binary complex, through which the intrinsic plasticity of the protein is considered, is also relevant for achieving reliable and

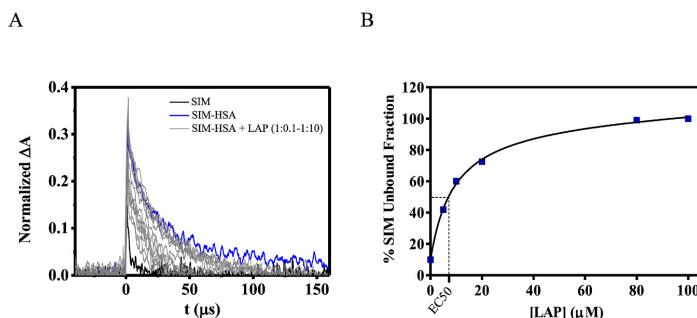


Fig. 8. A) Decays at 410 nm for SIM (black), SIM-HSA alone (blue) or in the presence of increasing amounts of LAP (gray). B) Percentage of unbound SIM fraction at 1:1 SIM-HSA ratio in the presence of increasing amounts of LAP. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

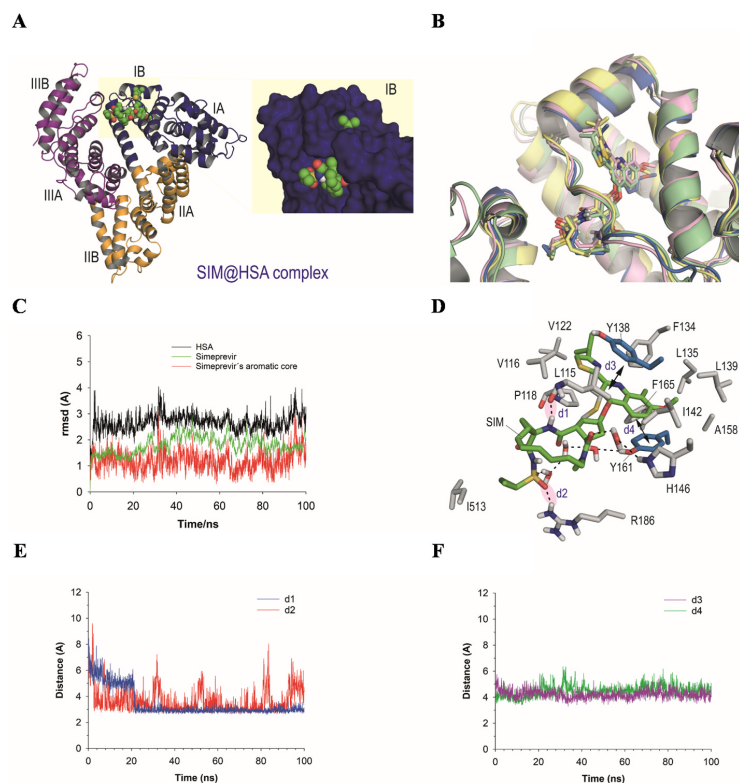


Fig. 9. SIM binding mode against HSA protein obtained by MD simulation studies. (A) General and close views of the SIM@HSA binary complex. Snapshot taken after 80 ns of simulation. The domains (I–III) and sub-domains (A, B) of the protein are shown in blue, orange, and purple colors, respectively, and labeled. Note how SIM (spheres) is deeply buried in sub-domain IB (site 3) of the protein. (B) Superposition of several snapshots taken during the whole simulation. Note how the ligand is very stable within the pocket as no relevant changes are identified. (C) RMSD plots for the protein backbone (C α , C, O and N atoms), SIM and its quinoline core (average values of 1.8 Å, 2.7 Å and 1.2 Å, respectively). (D) Main contacts of SIM with the protein. Relevant hydrogen bonding interactions (black dashed lines) and protein residues are shown and labeled. (E) Stability of the hydrogen bonding interactions. Variation of the relative distances between the NH amide group of the ligand and the main carbonyl group of L115 (d1) and the oxygen atom of the sulfonamide group of the ligand and the guanidinium group of R186 (d2). (F) Stability of the π - π stacking interactions. Variation of the relative distances between the center of mass of quinoline ring of SIM and residues Y138 (d3, average distance of 4.2 Å) and Y161 (d4, average distance of 4.6 Å) during the whole simulation. For calculating average distances, only the last 80 ns of simulation are considered. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

realistic results. To this end, the highest score solution obtained by docking and the protein were immersed in a truncated octahedron of water molecules obtained with the molecular mechanics force field Amber and subjected to 100 ns of simulation.

Our simulation studies revealed that SIM would be buried in sub-domain IB of the protein through its quinoline group allocating its macrocyclic moiety pointing towards the interface between domains I and III (Fig. 9A). The ligand proved to be very stable in the pocket, since no significant changes were observed, either in the binding

conformation of the ligand or that of the SIM@HSA binary complex, during the whole simulation (Fig. 9B). Thus, the analysis of the root-mean-square deviation (rmsd) of the protein backbone (C α , C, O and N atoms), the ligand and its quinoline group afforded low average values of 1.8 Å, 2.7 Å and 1.2 Å, respectively, for the whole simulation (Fig. 9C). SIM would be anchored to sub-domain IB through two hydrogen bonding interactions, one between the amide NH group in the SIM's macrocycle moiety and the main carbonyl group of L115, and the second between its sulfonamide group and the guanidinium group of

R186 (Fig. 9D). The latter interactions proved to be very stable, showing average distances during the last 80 ns of simulation of 3.0 Å and 3.5 Å, respectively (Fig. 9E). Additional hydrogen bonds are also established by the ligand through both faces of its macrocycle moiety with the side chains of residues H146 and Y161 via a network of water molecules. The arrangement of the ligand is further stabilized within the pocket by a strong sandwich-like π - π stacking interaction with residues Y138 and Y161 that trap the quinoline moiety between them. The latter interaction revealed to be strong as no significant variation of the relative distances between the center of mass of the quinoline ring and the phenol groups in Y138 and Y161 was observed during the whole simulation (Fig. 9F). Finally, the ligand is further stabilized in sub-domain IB thanks to a set of hydrophobic interactions with the nonpolar residues of the pocket, specifically L115, V116, P118, V122, F134, L135, L139, I142, A158 and I513.

4. Conclusions

Comprehensive photochemical and photobiological studies reveal SIM-mediated photodamage to biomolecules, leading ultimately to cell death. This drug displays a significant absorption band in the active region of solar light, so it may trigger photosensitivity reactions. The key transient species generated upon SIM irradiation is the triplet excited state, characterized by its absorption band at 400 nm. This species is efficiently quenched by oxygen giving rise to singlet oxygen, which is responsible for the oxidation of lipids and DNA (Type II mechanism). In the presence of HSA, the photobehavior is dominated by binding to site 3 of the protein, to give a stable SIM@HSA complex. Inside the complex, quenching of the triplet excited state is less efficient, which results in a longer triplet lifetime and in a deceased singlet oxygen formation. Hence, SIM-mediated photooxidation of the protein occurs through a radical (Type I) mechanism.

In summary, the obtained results confirm that porphyrin elevation in patients treated with SIM may not be the only mechanism responsible for SIM-associated clinical photosensitivity. Instead, photochemical mechanisms may operate leading to the generation of cellular oxidative stress associated with damage to lipids, proteins and DNA, ultimately resulting in cellular photo(geno)toxicity. These considerations have to be taken into account by the doctors to have a better knowledge of the SIM photoinduced adverse effects before prescribing to patients and, thus, give them photoprotection guidelines such as the employment of sunscreens.

Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation [PID2020-115010RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 (I.A.), PID2019-105512RB-I00/AEI/10.13039/501100011033 (CG-B) and FPU predoctoral fellowship for M. El O.], Axencia Galega de Innovación (2020-PG067, CG-B), the Xunta de Galicia [ED431C 2021/29 and the Centro singular de investigación de Galicia accreditation 2019–2022 (ED431G 2019/03)], and the European Regional Development Fund (ERDF) is gratefully acknowledged. All authors are grateful to the Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA) for use of the Finis Terrae computer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.006>.

References

- [1] F. Negro, A. Alberti, The global health burden of hepatitis C virus infection, *Liver Int.* 31 (Suppl 2) (2011) 1–3.
- [2] W.H.O. Hepatitis, C Fact Sheet No 164, 2013 [cited 2021 2 December].

- [3] A. Petruzzello, et al., Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes, *World J. Gastroenterol.* 22 (34) (2016) 7824–7840.
- [4] T.I. Lin, et al., In vitro activity and preclinical profile of TMC435350, a potent hepatitis C virus protease inhibitor, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (4) (2009) 1377–1385.
- [5] M. Sanford, Simeprevir: a review of its use in patients with chronic hepatitis C virus infection, *Drugs* 75 (2) (2015) 183–196.
- [6] R. Flisiak, J. Pogorzelska, M. Flisiak-Jackiewicz, Hepatitis C: efficacy and safety in real life, *Liver Int.* 37 (Suppl 1) (2017) 26–32.
- [7] Z. Marino, et al., High efficacy of Sofosbuvir plus Simeprevir in a large cohort of Spanish cirrhotic patients infected with genotypes 1 and 4, *Liver Int.* 37 (12) (2017) 1823–1832.
- [8] M.V. Lin, R. Chung, Recent FDA approval of sofosbuvir and simeprevir. Implications for current HCV treatment, *Clin Liver Dis (Hoboken)* 3 (3) (2014) 65–68.
- [9] H.S. Lo, et al., Simeprevir potently suppresses SARS-CoV-2 replication and synergizes with remdesivir, *ACS Cent. Sci.* 7 (5) (2021) 792–802.
- [10] F.S. Hosseini, M. Amanlou, Anti-HCV and anti-malaria agent, potential candidates to repurpose for coronavirus infection: virtual screening, molecular docking, and molecular dynamics simulation study, *Life Sci.* 258 (2020), 118205.
- [11] M.A. Bakowski, et al., Drug repurposing screens identify chemical entities for the development of COVID-19 interventions, *Nat. Commun.* 12 (1) (2021) 3309.
- [12] Z.W. Eyre, A.M. Secrest, J.L. Woodcock, Photo-induced drug eruption in a patient on combination simeprevir/sofosbuvir for hepatitis C, *JAAD Case Rep* 2 (3) (2016) 224–226.
- [13] C.L. Simpson, D. McCausland, E.Y. Chu, Photo-distributed lichenoid eruption secondary to direct anti-viral therapy for hepatitis C, *J. Cutan. Pathol.* 42 (10) (2015) 769–773.
- [14] F. Borgia, et al., Mucocutaneous toxicity during simeprevir treatment for hepatitis C. A single institution, retrospective case series, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83 (5) (2017) 1152–1154.
- [15] M.P. Manns, et al., Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection: pooled safety analysis from Phase IIb and III studies, *J. Viral Hepat.* 22 (4) (2015) 366–375.
- [16] L. Boglione, et al., Role of simeprevir plasma concentrations in HCV treated patients with dermatological manifestations, *Dig. Liver Dis.* 49 (6) (2017) 705–708.
- [17] L.D. Crow, et al., Medications associated with increased risk of keratinocyte carcinoma, *Dermatol. Clin.* 37 (3) (2019) 297–305.
- [18] F. Palumbo, et al., Enhanced photo(geno)toxicity of demethylated chlorpromazine metabolites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 313 (2016) 131–137.
- [19] G. García-Lainez, et al., Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 341 (2018) 51–55.
- [20] G. García-Lainez, et al., In vitro assessment of the photo(geno)toxicity associated with Lapatinib, a Tyrosine Kinase inhibitor, *Arch. Toxicol.* 95 (1) (2021) 169–178.
- [21] L. Tamarit, et al., Photoprocesses of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib: from femtoseconds to microseconds and from solution to cells, *Chem. Sci.* 12 (36) (2021) 12027–12035.
- [22] I. Gutiérrez, S.G. Bertolotti, M.A. Biasutti, A.T. Soltermann, N.A. García, Quinones and hydroxyquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen, *Can. J. Chem.* 75 (4) (1997) 423–428.
- [23] OECD, Test No. 432, in: *In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, 2019.
- [24] E.H. Pap, et al., Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591), *FEBS Lett.* 453 (3) (1999) 278–282.
- [25] I.O.L. Bacellar, M.S. Baptista, Mechanisms of photosensitized lipid oxidation and membrane permeabilization, *ACS Omega* 4 (26) (2019) 21636–21646.
- [26] G. Colombo, et al., A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1019 (2016) 178–190.
- [27] P. Möller, Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, *Mutat. Res.* 612 (2) (2006) 84–104.
- [28] I. Vaya, et al., Characterization of locally excited and charge-transfer states of the anticancer drug lapatinib by ultrafast spectroscopy and computational studies, *Chemistry* 26 (68) (2020) 15922–15930.
- [29] I. Andreu, et al., Protein binding of lapatinib and its N- and O-dealkylated metabolites interrogated by fluorescence, ultrafast spectroscopy and molecular dynamics simulations, *Front. Pharmacol.* 11 (2020), 576495.
- [30] P.A. Zunszain, et al., Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid, *BMC Struct. Biol.* 3 (1) (2003) 6.
- [31] G. Jones, et al., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 11Edited by F. E. Cohen, *J. Mol. Biol.* 267 (3) (1997) 727–748.
- [32] O. Molins-Molina, et al., Photobinding of triflusal to human serum albumin investigated by fluorescence, proteomic analysis, and computational studies, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 1028.
- [33] D. Case, et al., Amber 2017, University of California, San Francisco, 2017.
- [34] J. Cadet, K.J.A. Davies, Oxidative DNA damage & repair: an introduction, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 2–12.
- [35] G.P. Drummen, et al., C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (4) (2002) 473–490.
- [36] M. Laguerre, J. Lecomte, P. Villeneuve, Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges, *Prog. Lipid Res.* 46 (5) (2007) 244–282.

- [37] L. Tamarit, et al., Photoprocesses of the tyrosine kinase inhibitor gefitinib: from femtoseconds to microseconds and from solution to cells, *Chem. Sci.* 12 (36) (2021) 12027–12035.
- [38] J. Bai, et al., Oxidation of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine leads to substantial DNA-histone cross-links within nucleosome core particles, *Chem. Res. Toxicol.* 31 (12) (2018) 1364–1372.
- [39] A. Azqueta, A.R. Collins, The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair, *Arch. Toxicol.* 87 (6) (2013) 949–968.
- [40] K. Nakai, D. Tsuruta, What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 22 (19) (2021).
- [41] W.H. Melhuish, Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute1, *J. Phys. Chem.* 65 (2) (1961) 229–235.
- [42] S. Hackbarth, et al., New insights to primary photodynamic effects–Singlet oxygen kinetics in living cells, *J. Photochem. Photobiol., B* 98 (3) (2010) 173–179.
- [43] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (3) (2003) 761–770.
- [44] M.S. Baptista, et al., Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways, *Photochem. Photobiol.* 93 (4) (2017) 912–919.
- [45] W.L. DeLano, The PyMOL Molecular Graphics System, 2002.
- [46] M.Z. Kabir, et al., Characterization of the binding of an anticancer drug, lapatinib to human serum albumin, *J. Photochem. Photobiol., B* 160 (2016) 229–239.
- [47] S. Curry, et al., Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites, *Nat. Struct. Biol.* 5 (9) (1998) 827–835.