

	<b>GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS</b>		<b>CÓDIGO</b>	FO-GS-15
			<b>VERSIÓN</b>	02
	<b>ESQUEMA HOJA DE RESUMEN</b>		<b>FECHA</b>	03/04/2017
			<b>PÁGINA</b>	1 de 1
<b>ELABORÓ</b>		<b>REVISÓ</b>		<b>APROBÓ</b>
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): JOHAN SEBASTIAN                      APELLIDOS: CONSUEGRA SIERRA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): EDITH    APELLIDOS: GONZÁLEZ GONZÁLEZ

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): ESTABLECIMIENTO, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR CETUXIMAB

Cetuximab es un tipo de anticuerpo monoclonal aprobado por la Food and Drugs Administration (FDA) en el año 2004 para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Su aplicación en estos estudios tiene como finalidad comprender mejor la efectividad de Cetuximab como tratamiento terapéutico. Al interactuar con los receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la superficie de las células cancerosas, Cetuximab bloquea su activación y, por lo tanto, reduce su capacidad de proliferación. En este proyecto se estableció como objetivo establecer y validar una metodología para evaluar la inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab in vitro utilizando diferentes líneas celulares provenientes de cáncer de mama, cáncer de colon y carcinoma hepatocelular.

**PALABRAS CLAVES:** Cetuximab, Inmunoterapia, Factor de crecimiento epidérmico y Anticuerpo terapéutico

**PÁGINAS:** 81    **PLANOS:** 4    **ILUSTRACIONES:** 20

**ESTABLECIMIENTO, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA  
METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN  
INDUCIDA POR CETUXIMAB**

**JOHAN SEBASTIAN CONSUEGRA SIERRA**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**

**2023**

**ESTABLECIMIENTO, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA  
METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN  
INDUCIDA POR CETUXIMAB**

**JOHAN SEBASTIAN CONSUEGRA SIERRA**

**Proyecto de investigación presentado como requisito para obtener el grado de**

**INGENIERO BIOTECNOLÓGICO**

**DIRECTORA:**

**DRA. EDITH GONZÁLEZ GONZÁLEZ**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA**

**2023**



## ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

**FECHA:** 23 de junio del 2023

**HORA:** 10:00 A.M.

**LUGAR:** UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – SUSTENTACION VIRTUAL

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “ESTABLECIMIENTO, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA EVALUAR LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR CETUXIMAB.”

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** LILIANA YANET SUAREZ CONTRERAS  
YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA  
GERMAN LUCIANO LOPEZ BARRERA

**ENTIDAD:** Instituto Politécnico Nacional (IPN)

**DIRECTOR:** Dra. Edith Gonzalez Gonzalez

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Johan Sebastián Consuegra Sierra	1611431	4.7

**OBSERVACIONES:** MERITORIA.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

*Liliana Yanet Suárez Contreras*

*Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza*

*German Luciano López Barrera*

\_\_\_\_\_  
Liliana Yanet Suárez Contreras

\_\_\_\_\_  
Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza

\_\_\_\_\_  
German Luciano López Barrera

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular** \_\_\_\_\_

*Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza*

## Resumen

El cáncer es una de las principales enfermedades causante de millones de muertes al año en todo el mundo, convirtiéndola en una problemática con un panorama poco prometedor para las personas que desarrollan esta enfermedad; debido a esto, en los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias que permiten hacerle frente a esta afección, un ejemplo de esto es la inmunoterapia, la cual consiste de la utilización de herramientas del sistema inmune, como anticuerpos monoclonales utilizados como terapias dirigidas que permiten la disminución del avance de esta enfermedad. En este trabajo se evaluó la actividad biológica de Cetuximab, anticuerpo monoclonal quimérico cuya molécula blanco es el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) el cual está sobre-expresado en diferentes tipos de cáncer y está relacionado con la progresión de esta enfermedad. Para evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de este anticuerpo se utilizaron las líneas celulares HepG2, HCT-116 y BT-474 las cuales provienen de diferentes tipos de cáncer. Los resultados obtenidos demostraron que estas células son resistentes a este mAb, información que se pudo relacionar con los resultados obtenidos por otros investigadores.

## **Agradecimientos**

Como agradecimientos me gustaría destacar a mi Directora de tesis la Dra. Edith González por su paciencia, tiempo y dedicación prestada durante el desarrollo de este proyecto, la cual se convirtió en lo más cercano a una madre en México, así mismo a la Dra. Sonia Mayra Pérez Tapia por haberme recibido tan amablemente en la UDIBI y permitirme avanzar profesionalmente, al Dr. Sergio Andrés Torres Pérez por su confianza, apoyo y amistad, además de su recomendación que permitió darle inicio a este proyecto en México y abrir paso a esta nueva etapa en mi vida.

Adicional a estas personas también me gustaría mencionar a aquellas que contribuyeron a mi desarrollo como persona, a mi mamá que siempre me impulsó a cumplir mis sueños y me motivaba a seguir adelante, a mi papá cuyo apoyo incondicional siempre estuvo presente cuando más lo necesitaba y a mis hermanos que siempre estuvieron presentes, a mis mejores amigas mi querida Eliana y Karime cuya amistad siempre se mantuvo y se mantendrá por muchos años incluso a pesar de la distancia, así como el inmenso el cariño que sus familias me ofrecieron y a mis amigos de la universidad que recuerdo con mucha felicidad.

A los amigos que hice en México tanto dentro del entorno del laboratorio como los que hice fuera de él que en tan poco tiempo se lograron ganar un lugar especial en mi corazón y de los cuales pude aprender una cultura que diferente. A mi querida roomie por un año mi querida amiga Jessica con la cual vivimos juntos nuevas experiencias en un lugar desconocido y que junto a Solangy e Ian me convirtieron en parte de su familia y siempre me apoyaron, a Alejandra y su familia por hacerme sentir muy bien recibido en su hogar.

## Tabla de contenido

<b>Introducción</b>	<b>12</b>
<b>1. El problema</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Título</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Formulación del problema</b>	<b>14</b>
<b>1.4. Justificación</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>1.5.1. Objetivo general</b>	<b>15</b>
<b>1.5.2. Objetivos específicos</b>	<b>15</b>
<b>1.6 Alcances y limitaciones</b>	<b>15</b>
<b>1.6.1 Alcances</b>	<b>16</b>
<b>1.6.2 Limitaciones</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Delimitaciones</b>	<b>16</b>
<b>1.7.1 Delimitación espacial</b>	<b>16</b>
<b>1.7.2 Delimitación temporal</b>	<b>16</b>
<b>1.7.3 Delimitación conceptual</b>	<b>17</b>
<b>2. Marco referencial</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Antecedentes</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Marco teórico</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1 Factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su papel en la carcinogénesis</b>	<b>21</b>

2.2.2. Desarrollo de anticuerpos Monoclonales y obtención mediante herramientas de Ingeniería Genética.	27
2.2.3 Aplicabilidad de los anticuerpos Monoclonales en diferentes blancos terapéuticos	35
2.2.4 Uso de Cetuximab (Erbix®) como terapia dirigida en el tratamiento de cáncer	37
2.2.5. Validación de métodos analíticos	41
2.3. Marco legal	42
3. Diseño metodológico	42
3.1 Tipo de investigación	42
3.2 Población y muestra	42
3.3 Hipótesis	42
3.4. Variables	42
3.4.1 Dependientes	43
3.4.2 Independientes	43
3.4.3 Intervinientes	43
3.5. Fases de la investigación	43
4. Resultados y discusiones	48
4.1 Ensayos de proliferación celular	48
4.2 Ensayos de inhibición de la proliferación	52
4.2.1 Ensayos de inhibición de la proliferación usando línea celular HepG2	55

<b>4.2.2 Ensayos de inhibición de la proliferación mediada por Cetuximab utilizando la línea celular HCT-116.</b>	<b>56</b>
<b>4.2.3 Ensayos de inhibición de la proliferación mediada por Cetuximab utilizando la línea celular BT-474</b>	<b>57</b>
<b>4.3. Validación de la metodología.</b>	<b>67</b>
<b>Conclusión</b>	<b>69</b>
<b>Recomendación</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de expresión de EGFR en algunos tipos de cáncer.	26
<b>Tabla 2.</b> Ejemplos de anticuerpos terapéuticos disponibles comercialmente.	36
<b>Tabla 3.</b> Medios de cultivos utilizados según la línea celular	44
<b>Tabla 4.</b> Mecanismos de resistencia a Cetuximab.	62

## Lista de figuras

<b>Figura 1. Estructura representativa de un dímero de EGFR después de su unión al ligando.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 2. Representación esquemática de la activación y señalización de EGFR.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3. Señalización de las rutas P13K/AKT Y RAS/MAPK.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 4. Esquema general de un anticuerpo monoclonal.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Conformación estructural de las 5 inmunoglobulinas existentes.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 6. Diferentes estrategias para el descubrimiento de anticuerpos en modelos animales y ensayos in vitro.</b>	<b>33</b>
<b>Figura 7. Clasificación de anticuerpos monoclonales terapéuticos según su tipo.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 8. Mecanismos de acción de Cetuximab.</b>	<b>39</b>
<b>Figura 9. Representación gráfica del Mecanismo de acción de cetuximab en el receptor de factor de crecimiento epidérmico cuando se presenta en baja expresión o con mutaciones.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 10. Representación gráfica del procedimiento utilizado para llevar a cabo el ensayo de la proliferación celular.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11. Gráfico de proliferación celular utilizando la línea celular. Imagen (A) HCT-116 e imagen (B) BT-474.</b>	<b>50</b>
<b>Figura 12. Degradación de MTS en formazan mediado por enzimas deshidrogenasas de células metabólicamente activas.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 13. Representación gráfica de la metodología establecida para llevar a cabo la inhibición de la proliferación.</b>	<b>52</b>

<b>Figura 14. Preparación de los tratamientos para obtener una concentración de Cetuximab entre 500µg/ml hasta 1µg/ml.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 15. Procedimiento para la preparación de tratamientos de Cetuximab mediante diluciones seriadas 1:3 partiendo de concentración de 500 µg/ml que se obtenía de una dilución previa 1:10 del anticuerpo comercial.</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular</b>	<b>55</b>
<b>Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular</b>	<b>56</b>
<b>Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular</b>	<b>56</b>
<b>Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular</b>	<b>57</b>
<b>Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular del ensayo de inhibición de la proliferación</b>	<b>58</b>

## Introducción

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico originado a partir de la región variable del anticuerpo murino anti-EGFR M225 y la región constante de una inmunoglobulina humana G1 (Hanck-Silva et al., 2020) el blanco específico al cual reconoce es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Vincenzi et al., 2008), la cual es una glicoproteína transmembranal que contiene una tirosina quinasa específica; su dominio extracelular está presente en algunas células de cáncer humano las cuales sobre expresan este receptor. Cetuximab es producido en la línea celular de mamífero Sp2/0, mediante tecnología de ADN recombinante y actúa bloqueando la vía de señalización que estimula la proliferación y el crecimiento de células cancerígenas (Kattia et al., 2019). El mecanismo de acción que presenta el Cetuximab implica la unión del anticuerpo monoclonal (mAb) al EGFR inhibiendo la señalización de respuestas en cascada que influyen en diferentes mecanismos de acción celulares como la proliferación celular, angiogénesis, metástasis y apoptosis (Hanck-Silva et al., 2020).

Los ligandos conocidos del EGFR son el factor de crecimiento epidérmico (EGF en inglés), el transformador del factor de crecimiento Alfa o Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ), entre otros, los cuales al conjugarse de manera eficaz induce la dimerización del receptor resultando en la autofosforilación de la tirosina residual y consecuentemente en la transducción de señales en cascada vía RAS/RAF/MEK (MAP quinasa) y la vía PI3K/AKT (Okada et al., 2014). En este estudio se evaluó la acción inhibitoria del Cetuximab en diferentes líneas celulares con el objetivo de establecer, estandarizar y validar una metodología que pueda ser usada para evaluar la actividad antiproliferativa de productos biotecnológicos que contengan como principio activo cetuximab.

## **1. El problema**

### **1.1 Título**

Establecimiento, estandarización y validación de una metodología para evaluar la inhibición de la proliferación inducida por cetuximab

### **1.2 Planteamiento del problema**

El cáncer es una de las principales problemáticas de salud pública a nivel mundial, la cual, de acuerdo con lo reportado en el 2021 por la OMS (*Cáncer*, s. f.), ocasionó alrededor de 10 millones de muertes en todo el mundo y 20 millones más fueron diagnosticadas con esta misma enfermedad, en la actualidad se reporta como una de las enfermedades de mayor importancia clínica en la población humana y cuya tasa de mortalidad puede variar según el tipo de cáncer, la edad, el sexo y otros factores de mortalidad en la población humana. El cáncer se deriva de una acumulación de distintas mutaciones que afectan principalmente el ciclo celular, esta desregulación genética causa que las células se dividan rápidamente y de forma descontrolada, esta enfermedad se puede desarrollar en cualquier edad y órgano del cuerpo por lo cual se denomina según el tejido en el cual se desarrolle el tumor (Krieghoff-Henning et al., 2017).

El tipo de cáncer con mayor implicación en la salud mundial es el cáncer de pulmón presentando cerca de 1.8 millones de muertes para el año 2020, seguido por el cáncer de colon con más de 916 mil muertes registradas para el mismo año, , en tercer, cuarto y quinto lugar se

encuentran el cáncer hepático, cáncer gástrico y cáncer de mama con 830 mil , 769 mil y 685 mil defunciones en el mundo para el año 2020 según lo reportado por la OMS (OMS, 2020).

Debido a esta problemática diferentes grupos de investigación han enfocado su trabajo en el desarrollo de terapias de diferente naturaleza: radioterapias, quimioterapias e inmunoterapias usando anticuerpos con blancos terapéuticos (anticuerpos monoclonales) para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Muchas de las patentes de estos medicamentos que se usan en la inmunoterapia se están venciendo, por lo cual es necesario tener un estándar de validación que permita establecer parámetros de calidad para evaluar los nuevos medicamentos que se están desarrollando y colocando en el mercado.

### **1.3. Formulación del problema**

¿Por qué es importante la validación de un método analítico que tenga la finalidad de obtener un procedimiento mediante el cual se pueda determinar la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas mediada por Cetuximab?

### **1.4. Justificación**

Los avances en la biotecnología han permitido el desarrollo de nuevas alternativas medicinales incluyendo el uso de anticuerpos terapéuticos, siendo esta una de las herramientas revolucionarias que ha tenido más impacto en la sociedad, su principal aplicación es en el uso de inmunoterapias, debido a su alta e especificidad en el reconocimiento de su molécula blanco, así como la acción efectora de la porción Fc como la citotoxicidad celular dependiente de

complemento y/o anticuerpo (ADCC y CDC respectivamente) de estas moléculas y, Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP), inducción de apoptosis, inhibición de la proliferación celular, entre otros (Lazar et al., 2006).

Entre las moléculas que pueden reconocer los anticuerpos se encuentran proteínas específicas de la superficie celular de las células cancerígenas, las cuales pueden funcionar como receptores para otras moléculas con actividad biológica y juegan un papel importante en la respuesta inmune por lo que han sido uno de los principales blancos terapéuticos de tumores sólidos en los últimos 20 años (Scott et al., 2012). Entre los mAb utilizados para el tratamiento de cáncer se encuentra Cetuximab, el cual se dirige a su antígeno EGFR presente en células de tejido epitelial como lo es en el caso de cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, entre otros (Wee & Wang, 2017).

## **1.5. Objetivos**

### **1.5.1. Objetivo general**

Establecer y validar una metodología para evaluar la inhibición de la proliferación inducida por Cetuximab

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Establecer las condiciones para evaluar la actividad antiproliferativa de Cetuximab como tiempo de exposición al anticuerpo terapéutico y la concentración.

## **1.6 Alcances y limitaciones**

### **1.6.1 Alcances**

El alcance de este proyecto es obtener la validación de una metodología cuyos resultados permitan establecer un procedimiento para inhibir la proliferación de células de cáncer que sobre expresen EGFR.

### **1.6.2 Limitaciones**

Este proyecto se realizó en modelos *in vitro* por lo que es fundamental realizar una adecuada manipulación de las células en base a las buenas prácticas de laboratorio (BPL) para evitar una posible contaminación que pueda afectar la ejecución de los experimentos y los resultados obtenidos.

## **1.7 Delimitaciones**

### **1.7.1 Delimitación espacial**

Este proyecto se realizó en el laboratorio de investigación de la Unidad de Desarrollo e Investigación en Bioterapéuticos (UDIBI) perteneciente a la Unidad de Desarrollo e Investigación Médica y Biotecnológica (UDIMEB) de la Escuela Nacional de Ciencias Biológica (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) ubicada en la ciudad de México.

### **1.7.2 Delimitación temporal**

El tiempo estimado para cumplir con los Objetivos fue de 9 meses.

### 1.7.3 Delimitación conceptual

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se consideraron los siguientes grupos de conocimientos:

- Anticuerpos terapéuticos
- Cáncer
- Cetuximab
- Hibridomas
- Proliferación Celular
- Inhibición de la proliferación celular
- Inmunoglobulinas
- Inmunoterapia
- Líneas Celulares

## 2. Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

Se tomaron como antecedentes estudios realizados por diferentes investigadores, en donde evaluaron la capacidad antiproliferativa de Cetuximab en diferentes líneas celulares. Sus resultados demostraron variabilidad en la respuesta dependiendo de la línea celular empleada, el tiempo de exposición al tratamiento y las concentraciones evaluadas.

- (Luca et al., 2014) In vitro combined treatment with cetuximab and trastuzumab inhibits growth of colon cancer cells. *Cell Proliferation*, 47(5), 435-447.

Se evaluaron diferentes líneas celulares como Caco-2, HCT-116 y HT-29. En Caco-2 no se observó una inhibición significativa a una concentración máxima de cetuximab de 40 µg/ml después de 48 horas de tratamiento, sin embargo, fue posible observar una inhibición de casi 50% utilizando una terapia combinada con Trastuzumab.

- (Valverde et al., 2017) eIF5A2 is an alternative pathway for cell proliferation in cetuximab-treated epithelial hepatocellular carcinoma. 8(11): 4670–4681.

Evaluaron la capacidad antiproliferativa del Cetuximab en diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal (CRC) Caco-2, HCT-116, HT-29 y DLD-1; a una concentración de 100 µg/ml, además de una terapia combinada con Celecoxib, el tratamiento de Cetuximab como

monoterapia presentó un efecto inhibitorio en Caco-2 de un 30-35% siendo en estas células donde se observó el mayor efecto anti-proliferativo entre todas las células evaluadas tanto en monoterapia como en la terapia combinada alcanzando con esta un 80%.

- (Fu et al., 2018) Targeted delivery of CD44s-siRNA by ScFv overcomes de novo resistance to cetuximab in triple negative breast cancer. *Molecular Immunology*, 99, 124-133.

Se emplearon diferentes líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, BT474, MDA-MB-468, MDA-MB-231, y MDA-MB-157. Se evaluó el tratamiento con Cetuximab a una concentración final de 0.5 nmol/L por un periodo de 4-7 día. En este ensayo se utilizó el reactivo Celltiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega, Madison, WI) para evaluar la inhibición de la proliferación celular. En células MCD-7 la cual no expresa mucho EGFR, la actividad de Cetuximab no fue muy notoria; por otro lado, en la línea MDA-MB-231 la cual expresa EGFR no se ha demostrado actividad antiproliferativa representativa; de igual manera BT474 expresa unos elevados niveles del dominio extracelular, a diferencia de MDA-MB-231 donde si ha sido posible demostrar actividad antiproliferativa.

- (Xu et al., 2005) Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3), 435-442.

En este trabajo se emplearon tres líneas celulares de cáncer de colon y dos líneas de cáncer de mama, HCT-116, Caco2, HT-29, MDA-MB-468 y SKBR-3, se evaluaron concentraciones de Cetuximab desde 0.5 µg/ml hasta 20 µg/ml por 48 horas. Se observaron resultados positivos; siendo las células MDA-468 en las que se presentó mayor inhibición a la concentración más alta del anticuerpo.

- (Kumar et al., 2014) KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. *Gastrointestinal Cancer Research: GCR*, 7(1), 23-26.

Se evaluó la actividad antiproliferativa en líneas celulares mutantes de KRAS G13D como HCT-116, T84, LoVo, por otro lado, también implementaron SW480 que es una KRAS G12V y finalmente una KRAS WT, la LIM1215. El ensayo se llevó a cabo usando el CellTiter 96® Aqueous nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI, USA), la LIM1215 fue la que presentó mayor sensibilidad al anticuerpo recombinante, seguido de las KRAS G13D y las KRAS G12V, siendo estas últimas la menos sensibles al tratamiento.

- (Xue et al., 2016) EIF5A2 is an alternative pathway for cell proliferation in cetuximab-treated epithelial hepatocellular carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 8(11), 4670-4681.

Se evaluaron las líneas celulares relacionadas con el carcinoma hepatocelular, Hep3B, Huh7 y HepG2; por otro lado, también estudiaron el efecto anti proliferativo del Cetuximab en

SNU-387 y SNU-449. Se evaluaron diferentes concentraciones de cetuximab, la concentración y línea celular en la que se observó efecto fue SNU-499 con un tratamiento a una concentración de 2000  $\mu\text{g/ml}$  seguida de SNU-387 en la misma concentración.

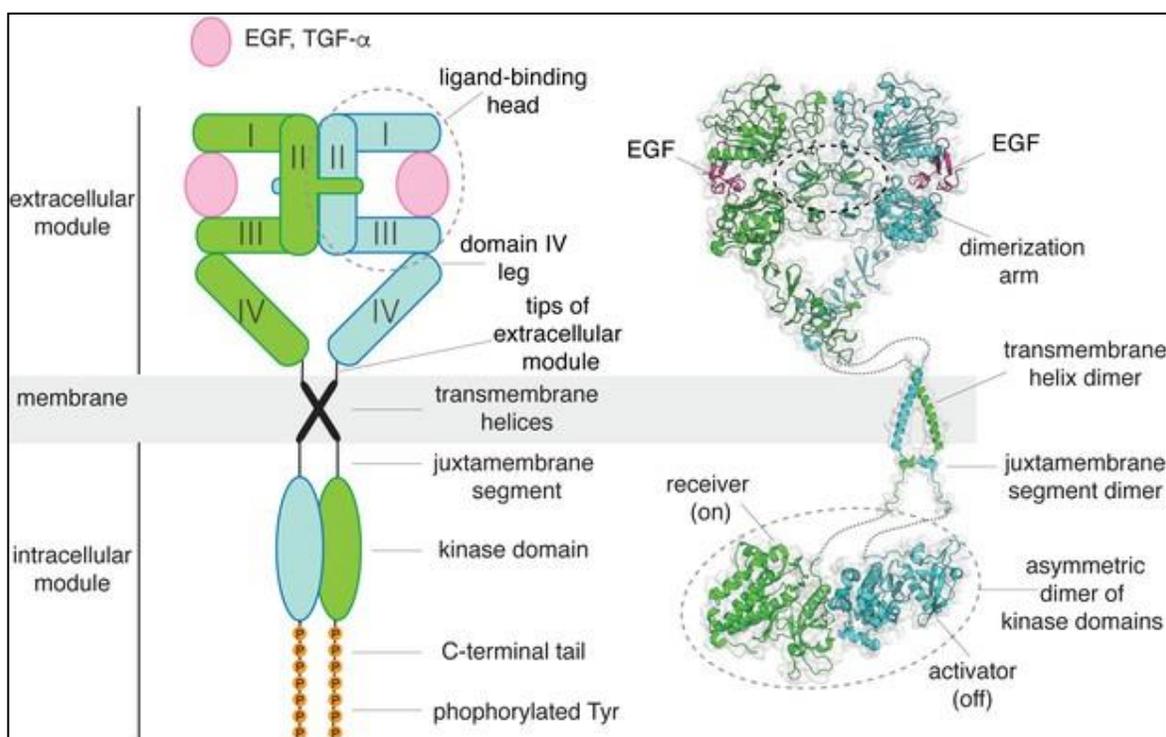
Con estos antecedentes se planteó el uso de las líneas celulares: BT474, HepG2 y HCT-116 las cuales se encuentran dentro del banco de líneas celulares de la UDIBI, para evaluar la actividad antiproliferativa de cetuximab.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su papel en la carcinogénesis**

En 1975 durante una colaboración entre diferentes investigadores se descubrió EGFR como una proteína transmembranal, en 1984 se aisló y clonó la secuencia de este receptor a partir de la línea celular A431, poco tiempo después fue reconocida como una proteína receptora de tirosina quinasa (RTKs), durante la década de 1980s se realizaron varias hipótesis de su implicación en la progresión del cáncer en varios tipos de tumores epiteliales que fueron respaldadas por otras investigaciones donde descubrieron su sobreexpresión en diferentes células cancerígenas y su desregulada señalización en la etiología de esta enfermedad, de forma más explícita EGFR es una glicoproteína de aproximadamente 170 kDa, también llamado HER1 el cual posee un dominio extracelular, un dominio transmembranal hidrofóbico, un dominio intracelular que posee actividad de tirosina quinasa y una cola C-terminal con residuos de quinasas para propagar la señalización río abajo (Brand et al., 2011), es expresado de forma transmembranal en condiciones fisiológicas normales y tiene un papel importante en células epiteliales malignas. La desregulación de este receptor se ha relacionado con la progresión y

diseminación metastásica en una gran variedad de tumores humanos como cáncer de mama, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer colorrectal, entre otros. La sobreexpresión es normalmente asociada con un estado avanzado de la enfermedad y mal pronóstico debido a que contribuye con la resistencia a los tratamientos contra el cáncer (Galizia et al., 2007). Estos receptores de tirosina quinasa (RTKs) regulan la transdiferenciación de células cancerosas a células endoteliales en un proceso de mimetismo vasculogénico (Talukdar et al., 2020).

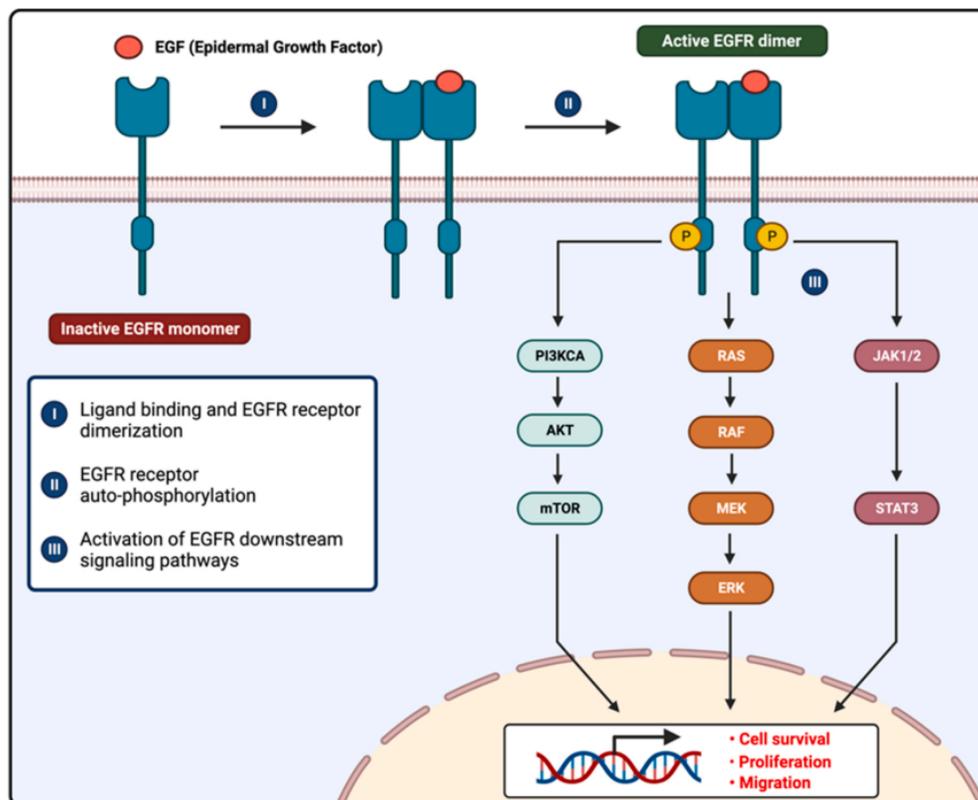


**Figura 1. Estructura representativa de un dímero de EGFR después de su unión al ligando.**

Imagen obtenida de “A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor” (Y. Huang et al., 2021).

Cuando EGFR está inactivo se encuentra presente en su forma monomérica, ubicado principalmente en la superficie de la membrana celular, el extremo N-terminal de este, localizado en el dominio extracelular permite la unión de diferentes tipos de ligando lo que lleva a su activación, los principales ligandos del EGFR son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), la activación del receptor conduce a la formación de homodímeros y/o heterodímeros con otros miembros de la familia de receptores que participan en el desarrollo normal de las células (ErbB,) siendo HER2 el principal compañero para heterodimerización de EGFR, altos niveles de expresión de este receptor pueden facilitar la activación y fosforilación que inducen a la activación de las cascadas de señalización como se observa en la figura 2. Cuando ocurre la dimerización se acercan los dominios intracelulares de tirosina quinasa c-terminal de ambas moléculas dando como resultado la autofosforilación y (Dutta & Maity, 2007).

La familia de receptores con actividad de tirosina quinasa HER consta de 4 miembros, los cuales son receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1/HER1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) y HER4 (ErbB4) (Fu et al., 2018).

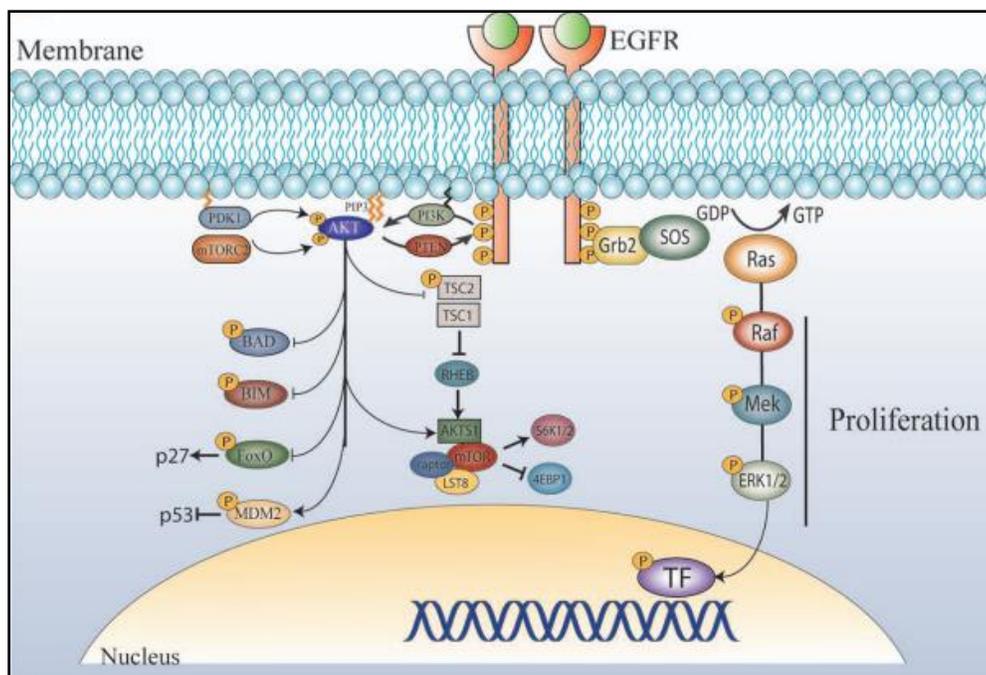


**Figura 2. Representación esquemática de la activación y señalización de EGFR.**

*Imagen obtenida de Hype or hope – Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC (Papini et al., 2021).*

Las principales vías de señalización iniciadas como consecuencia de la activación de EGFR son las que involucran proteína cinasa activada por mitógenos Ras-Raf y la ruta de fosfatidil inositol 3' cinasa y Akt (P13KCA/AKT), ambas rutas conducen a importantes procesos

biológicos, bioquímicos y fisiológicos en la célula como metástasis, angiogénesis, inhibición de apoptosis y proliferación celular, siendo la primera ruta mencionada la responsable de este último proceso en varios tumores humanos, una forma más detallada de estas rutas se encuentra en la figura 3.



**Figura 3. Señalización de las rutas P13K/AKT Y RAS/MAPK.**

Figura obtenida de “Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab” (Brand et al., 2011).

Las células normales tienen mecanismos de regulación de estas vías de señalización y requieren de la unión de su ligando al receptor para su posterior activación, a diferencia de las células normales, las células cancerosas comúnmente tienen una vía de señalización desregulada y pueden evadir el requisito de unión del ligando para su activación a través de una serie de mecanismos diferentes. Para empezar, es importante destacar que algunos tipos de cáncer

expresan un tipo de EGFR salvaje, también conocido en inglés como wild-type EGFR, este tipo de receptor conduce a su activación sin la necesidad del ligando, por otro lado, algunos tipos de cáncer sobre expresan el ligando TGF- $\beta$  lo que puede facilitar la activación del receptor y finalmente, algunas de las células cancerígenas pueden expresar algunas formas de EGFR mutantes lo que provoca que este se active de forma inapropiada, dentro de estas mutaciones se encuentran deleciones en el dominio de activación de la tirosina quinasa y deleciones en su dominio extracelular tal como se muestra en la variante EGFRvIII, la cual se presenta comúnmente en glioblastomas, entre otras mutaciones puntuales (Dutta & Maity, 2007), esta mutación se produce por la eliminación de los exones 2-7 del gen que codifica EGFR en las células cancerosas dejando incapaz a los ligandos de unirse de forma correcta a este receptor (Gan et al., 2013). Entre los tipos de cáncer en tejidos epiteliales se conoce que expresan diferentes niveles de EGFR, algunos de estos porcentajes de expresión se encuentran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Porcentajes de expresión de EGFR en algunos tipos de cáncer. Tabla adaptada a partir de Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy (Dutta & Maity, 2007)

Tipo de Tumor	Porcentaje de expresión de EGFR
Cáncer colorrectal	25-77
Cáncer páncreas	30-50
Cáncer de vejiga	31-48
Cáncer de próstata	39-47
Cáncer de ovario	35-70
Glioma (tumores cerebrales intra-axiales)	40-63
Cáncer de mama	14-91
Cáncer de pulmón	40-80
Cáncer de riñón	50-90
Cáncer de cabeza y cuello	80-100

### **2.2.2. Desarrollo de anticuerpos Monoclonales y obtención mediante herramientas de Ingeniería Genética.**

Los anticuerpos son parte de las moléculas efectoras del sistema inmune, están compuestos por una pequeña porción de carbohidratos y proteínas, volviéndolos de esta forma estructuralmente glicoproteínas. Los anticuerpos se producen por células plasmáticas que fueron diferenciadas a partir de linfocitos B activados, se sintetizan en los polirribosomas del retículo endoplásmico celular (CRE) donde son acarreadas hasta el aparato de Golgi donde se glicosilan y ser empaquetan en vesículas para ser exportadas al exterior de las células donde encuentran como receptores en estas mismas células, también llamados B Cell Receptor (BCR), sin embargo no todos los anticuerpos funcionan como BCR, algunos de estos se encuentran en secreción en el torrente sanguíneo y otros tejidos buscando neutralizar moléculas. las inmunoglobulinas tienen la capacidad de reconocer moléculas específicas, denominados antígenos que fueron los que indujeron a su producción (antígenos homólogos) (Machado et al., 2006), como ejemplo

proteínas de membranas de microorganismos patógenos, células extrañas o propias como en el caso de respuestas autoinmunes, material genético, lípidos y polisacáridos, entre otras.

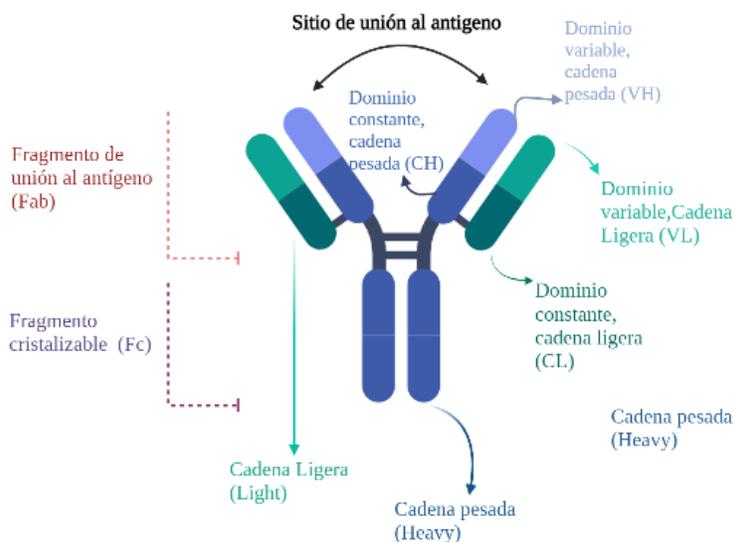
Los anticuerpos han sido utilizados como herramientas que participan en el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades en la actualidad, este tipo de tratamientos terapéuticos inició con los trabajos de Emil Von Behring y su colega Kitasato, genios de la microbiología, quienes lograron un hito importante en la historia de la medicina. La investigación de Von Behring comenzó alrededor de los 1880s con la difteria, una enfermedad infecciosa que causó una alta tasa de mortalidad infantil en Europa. Finalmente años después y mediante rigurosos experimentos descubrió que los animales que se habían sobrevivido a la infección por difteria desarrollaron una inmunidad natural contra esta enfermedad y que el suero contra la difteria, tenían la capacidad de neutralizar toxinas cuando se les suministraba dichos sueros en organismos sanos no inmunizados que se infectaban posteriormente con la enfermedad, de esta forma concluyeron que los animales al ser expuestos y estar en contacto con la enfermedad generaban antitoxinas que estaban presentes en el suero y de tener la capacidad de controlar la infección, este hallazgo se confirmó alrededor de los años 1890s cuando Von Behring se asoció con Kitasato, un médico japonés para investigar más a fondo esta teoría, hicieron experimentación con suero de animales y pacientes recuperadas de la infección por difteria, comprobando que la a inyección de suero de animales inmunizados en pacientes infectados con difteria producía una respuesta inmunológica que protegía al paciente de la enfermedad. En 1892, Von Behring y Kitasato produjeron el primer suero antitoxina contra la difteria, que se utilizó con éxito para tratar pacientes infectados. Además de tener un gran impacto en la medicina, la implementación de sueros tuvo un impacto significativo en la salud pública. Por primera vez, se pudo prevenir y tratar enfermedades infecciosas de manera efectiva logrando

salvar innumerables vidas, además, la producción de sueros sentó las bases para la producción de vacunas y la inmunología moderna permitiendo tener hoy en día enfermedades erradicadas como la viruela y la polio, esta investigación le hizo ser galardonado con el premio nobel de medicina en 1901, más adelante se denominaron anticuerpos a las antitoxinas presentes en los sueros por el bacteriólogo y bioquímico Paul Ehrlich a finales del siglo XIX. En el cuerpo humano no se encuentran dos moléculas de anticuerpos que sean idénticas entre sí, las inmunoglobulinas que se pueden obtener del suero de animales inmunizados a un antígeno en específico son glicoproteínas obtenidas de la estimulación simultanea de muchas células, todas ellas con la capacidad de reconocer un determinante antigénico del mismo antígeno, estos tipos de anticuerpos son denominados como anticuerpos policlonales, además de este tipo también se pueden encontrar aquellos que son producidos por una única célula y son idénticos entre sí, los cuales son denominados como anticuerpos monoclonales. La investigación sobre anticuerpos monoclonales ha sido un campo muy importante que ha permitido grandes avances en la lucha contra diversas enfermedades, incluyendo el cáncer, las enfermedades autoinmunitarias y las infecciones virales. Esta investigación ha sido reconocida por el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1984, otorgado a los científicos César Milstein, Georges Köhler y Niels Jerne por su trabajo pionero en la producción de anticuerpos monoclonales. La producción de anticuerpos monoclonales comenzó en la década de 1970, pero su uso terapéutico no fue posible hasta que Milstein, Köhler y Jerne desarrollaron técnicas para producir anticuerpos monoclonales de manera más eficiente. En particular, desarrollaron una técnica llamada fusión de células, que permitía combinar células de mieloma con células plasmáticas para producir células híbridas que producían anticuerpos monoclonales específicos. (*Anticuerpos monoclonales*, 2019).

En la década de 1960, Rodney Porter y Gerald Edelman descubrieron la estructura de los anticuerpos a través de su trabajo conjunto en la caracterización de estas moléculas. Sus hallazgos les valieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1972. Porter utilizó la técnica de la cromatografía para separar los anticuerpos en sus componentes individuales y demostrar que estaban formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Edelman, por su parte, utilizó la técnica de digestión enzimática para demostrar que estas cadenas estaban unidas por enlaces disulfuro. (Ramos-Bello & Llorente, 2009). Estos inmunoquímicos pudieron determinar y conocer la estructura básica de las inmunoglobulinas, dentro de su estructura básica se encuentra que están conformados por 4 cadenas polipeptídicas, 2 de ellas son cadenas pesadas con un peso molecular (PM) de 50 kD cada una y un tamaño de 420-440 aminoácidos y 2 cadenas ligeras con un PM de 25 kD compuesta entre 210 y 230 aminoácidos, dentro de estas cadenas ligeras y pesadas se encontró que tenían una región variable que poseen un sitio de unión con el antígeno por lo que fueron denominadas como fragmento Fab (del inglés *antigen binding fragment*), así como también se evidenció una región constante en la cadena pesada carente del sitio de combinación y por lo tanto de reaccionar con el antígeno la cual se le llamó Fragmento Fc por su inclinación a cristalizarse en su estado puro. Estas moléculas se encuentran unidas mediante enlaces de disulfuro y dentro de las funciones fundamentales que presentan estas inmunoglobulinas se distinguen que tienen la capacidad de reconocer y de unión a antígenos; (García Merino, 2011). Adicionalmente son capaces de generar diferentes respuestas después de unirse de manera eficiente con el antígeno, son también conocidas como respuestas efectoras. La estructura básica de un anticuerpo monoclonal se puede observar en la figura 4

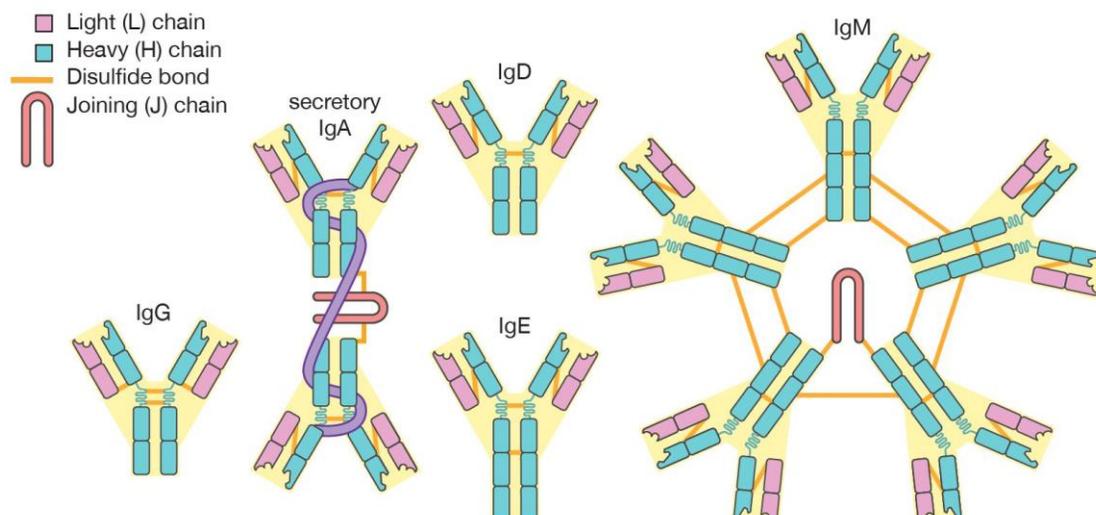
Con base a los estudios realizados se pudo establecer que existen 5 clases de anticuerpos que se clasifican de acuerdo a la estructura de las cadenas pesadas y ligeras como fueron la gamma, alfa, mu, delta y épsilon las cuales corresponden a las clases IgG, IgA, IgM, IgD, IgE respectivamente, las estructuras de los diferentes isotipos de anticuerpos se pueden observar en la figura 5.

Dentro de estos diferentes isotipos de anticuerpos se pueden diferenciar aquellos que se encuentran como moléculas monoméricas como las IgG, IgE e IgD, a diferencia de las IgA (se encuentran como dímeros y como monómeros) y las IgM que son poliméricas (pentámeros), las cuales además también poseen un polipéptido adicional en su estructura que fue denominado como “pieza de unión” o cadena J que proviene del inglés *Joining* y un segundo polipéptido llamado componente secretor o cadena S para el caso de las IgA y en cantidades más pequeñas en algunas IgM que puedan estar presente en las secreciones como la saliva, jugo gástrico y moco.



**Figura 4. Esquema general de un anticuerpo monoclonal.**

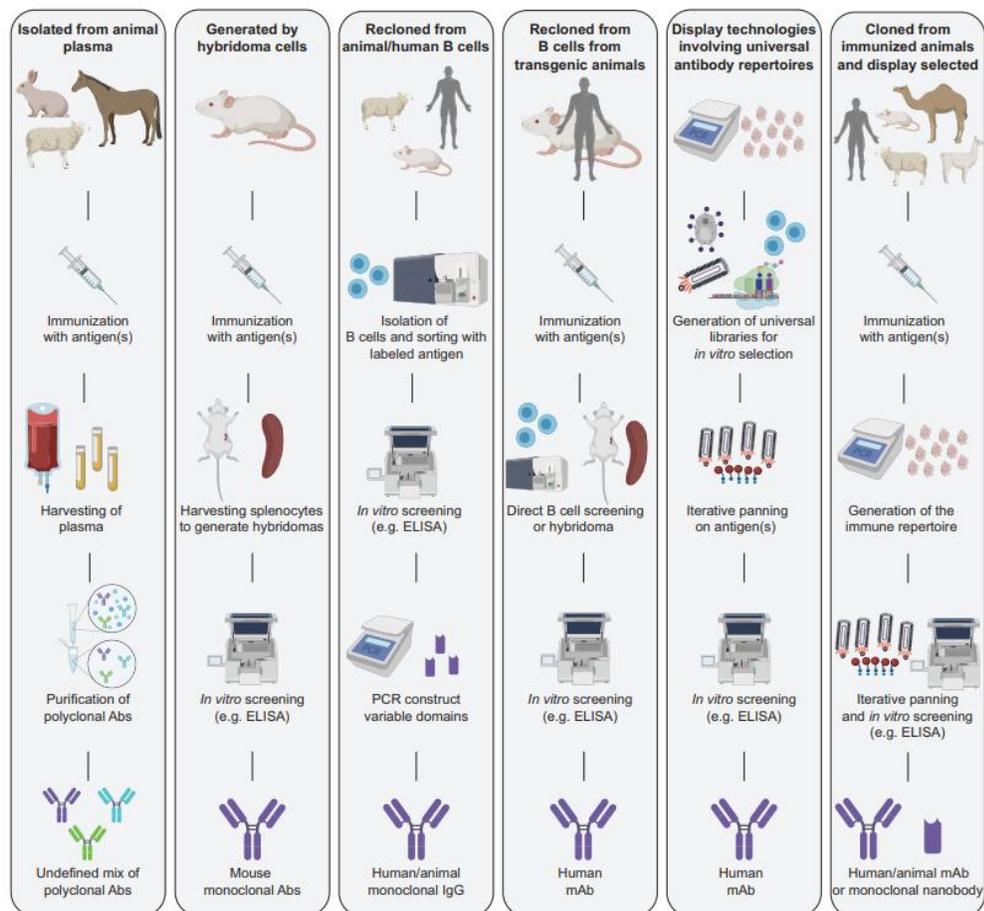
*Rediseñado utilizando BioRender.com a partir de la estructura básica de una inmunoglobulina elaborada por Villaescusa, L.*



**Figura 5. Conformación estructural de las 5 inmunoglobulinas existentes.**

*Imagen tomada de "Classes of immunoglobulin" (Immune System | Description, Function, & Facts | Britannica, 2023).*

La ciencia y el avance tecnológico han permitido obtener importantes hallazgos en la comunidad científica, entre estas podemos encontrar la secuenciación del genoma humano y de animales que han permitido la obtención de anticuerpos mediante diferentes tecnológicas y estrategias como las que se observan en la figura 6.



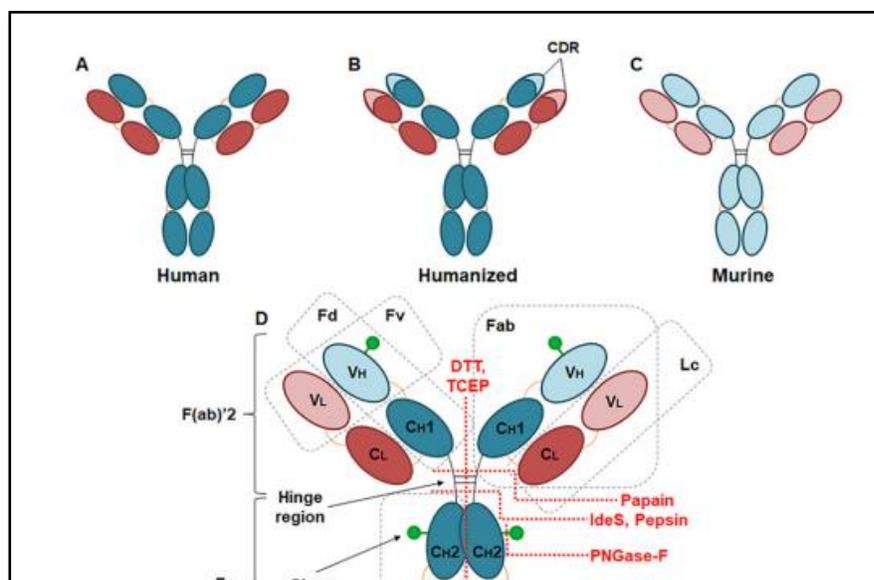
**Figura 6. Diferentes estrategias para el descubrimiento de anticuerpos en modelos animales y ensayos *in vitro*.**

Imagen obtenida del artículo “Animal Immunization, *in Vitro* Display Technologies, and Machine Learning for Antibody Discovery” (Laustsen et al., 2021).

La tecnología actual permite la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales mediante técnicas de ingeniería genética entre otras estrategias como se observa en la figura 6. Algunas de estas son aquellas inmunoglobulinas que se obtienen del aislamiento del plasma de un animal inmunizado, la cual consiste en la inmunización de los animales (se selecciona el animal según el origen de los Abs que se quieran obtener) con el antígeno de interés y posteriormente se realiza una purificación de las inmunoglobulinas policlonales, por otro lado también se pueden obtener mAbs mediante la generación de hibridomas (fusión entre células

plasmáticas y células de mieloma) para la obtención de inmunoglobulinas monoclonales dirigidas hacia un determinante antigénico en específico donde posteriormente se realiza una selección clonal mediante un screening *in vitro* que permite identificar las clonas optimas en función de la especificidad por el antígeno.

Existen diferentes tipos de anticuerpos monoclonales que se obtienen mediante diversas técnicas como ya se había mencionado anteriormente y que se clasifican según el origen al partir del cual se obtuvieron estas inmunoglobulinas. Dentro de estos que se pueden obtener se distinguen 4 tipos, en la figura 7 se muestra una forma más detallada sobre la composición estructural de estos anticuerpos .



**Figura 7. Clasificación de anticuerpos monoclonales terapéuticos según su tipo.**

Figura obtenida de “ A Critical Review of Properties and Analytical/Bioanalytical Methods for Characterization of Cetuximab” (Hanck-Silva et al., 2020).

Anticuerpos monoclonales de ratón (mAb ratón): cuya composición estructural del anticuerpo son proteínas 100% de ratón.

Anticuerpos monoclonales quiméricos (mAb quiméricos): las proteínas que forman parte de este anticuerpo son un 25% de ratón correspondiendo a sus regiones variables de la cadena ligera y cadena pesada y un 75% de proteínas humanas las cuales están presentes en la región constante de la cadena ligera y cadena pesada.

Anticuerpos monoclonales Humanizados (mAb Humanizados): Son anticuerpos cuyo CDR está compuesto de aminoácidos de ratón, el resto de su estructura son proteínas humanas.

Anticuerpos monoclonales Humanos (mAb Humanos): son secuencias de aminoácidos 100% humanas y por lo tanto son los más aceptados por el cuerpo humano evitando una respuesta inmune.

### **2.2.3 Aplicabilidad de los anticuerpos Monoclonales en diferentes blancos terapéuticos**

Durante los últimos años, varios grupos de investigadores y empresas biotecnológicas se han propuesto en la tarea de desarrollar diferentes anticuerpos contra blancos específicos, los resultados de estas investigaciones generaron anticuerpos monoclonales comerciales como lo fue en el caso del anticuerpo muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3 el cual consistía de un anticuerpo de ratón (IgG2) el cual se une y bloquea el CD3 expresado en linfocitos B, esto con la finalidad de prevenir el rechazo en el trasplante de riñón. Orthoclone OKT3 fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA para uso humano en 1986 (Liu, 2014), actualmente no se encuentra en uso debido a la inmunogenicidad que producía en los pacientes que recibían este tratamiento. La Antibody Society reporta cerca de 150 anticuerpos monoclonales terapéuticos aprobados o en proceso de aprobación por Estados Unidos (USA) y la Unión Europea (EU) para

diferentes tipos de enfermedades como cáncer, infecciones virales, asma, artritis reumatoide, dermatitis atópica entre muchas otras indicaciones (*Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US, s. f.*) , algunos ejemplos de estos se encuentran en la siguiente tabla.

**Tabla 2.** Ejemplos de anticuerpos terapéuticos disponibles comercialmente.

Anticuerpo terapéutico	Descripción
<b>Rituximab (Rituxan®)</b>	Anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra el antígeno de superficie CD20 de pacientes con linfoma de linfocitos B produciendo citotoxicidad en las células blanco, el CD20 está implicado en el desarrollo y diferenciación de células B
<b>Infliximab (Remicade®)</b>	Anticuerpo monoclonal quimérico dirigido hacia TNF el cual está involucrado directamente en la inmunidad innata y adaptativa, participa como mediador en procesos inflamatorios y autoinmunes
<b>Adalimumab (Humira®)</b>	Su blanco terapéutico es el TNF y que a diferencia del infliximab este es un anticuerpo monoclonal humano
<b>Trastuzumab (Herceptin®)</b>	Anticuerpo monoclonal humanizado cuyo

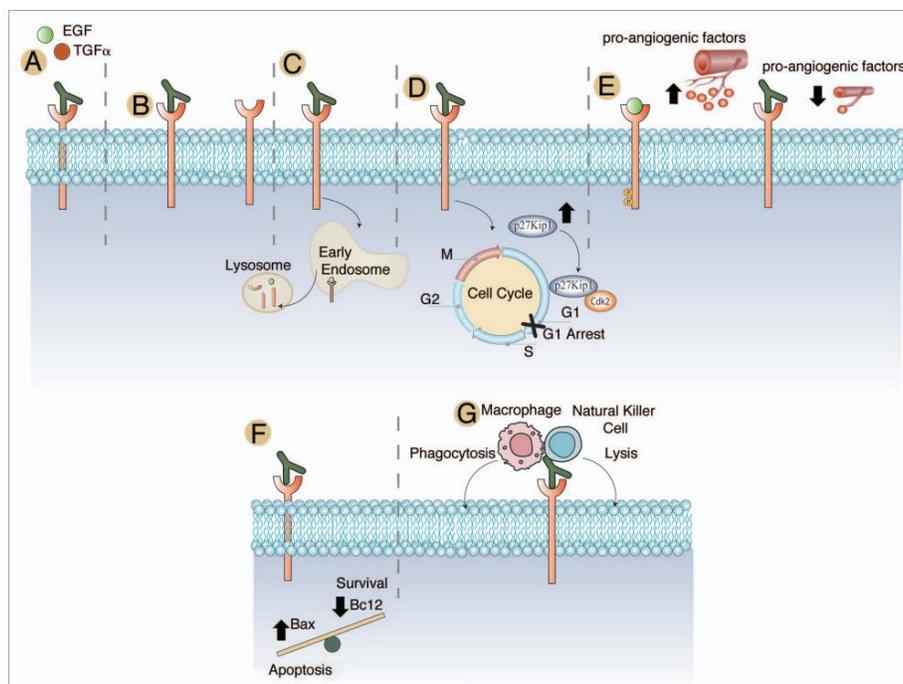
	<p>blanco terapéutico es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (HER2) el cual se sobreexpresa en un 25-30% de los casos de cáncer de mama, el HER2 está implicado en el crecimiento y división celular.</p>
<p><b>Cetuximab (Erbix®)</b></p>	<p>Anticuerpo monoclonal quimérico tipo IgG1 cuya diana terapéutica es el factor de crecimiento epidérmico EGFR, cuya unión con su ligando induce la activación de señales miogénicas en las células.</p>

#### **2.2.4 Uso de Cetuximab (Erbix®) como terapia dirigida en el tratamiento de cáncer**

En los últimos años se han desarrollado numerosas alternativas para el tratamiento del cáncer, entre estos encontramos aquellas que son dirigidas hacia el factor de crecimiento epidérmico EGFR para detener el crecimiento tumoral, inhibiendo su proliferación a través del uso de anticuerpos monoclonales (mAbs) como Cetuximab y Panitumumab que actúan bloqueando la unión del ligando al dominio extracelular del receptor como se observa en la figura 8 ó pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosina quinasa como Gefitinib y Erlotinib que interrumpen la unión de ATP del dominio citoplasmático para así inhibir la fosforilación que activan las cascadas de señalización y que a diferencia de los anticuerpos monoclonales estas

últimas moléculas no inducen la internalización y degradación del receptor y presentan modesta eficacia en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Dutta & Maity, 2007).

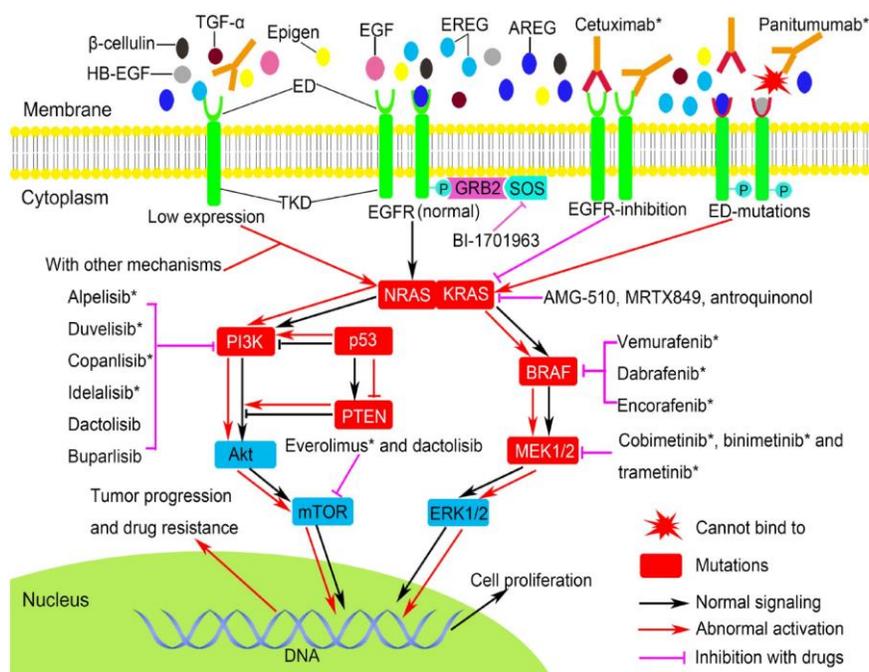
Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico recombinante de 152 kDa que se origina a partir de la fusión de la región variable de un anti-EGFR obtenido en ratón (M225) con la región constante de una IgG1 humana, el cual es expresado en la línea celular Sp2/0 (Yi et al., 2014). Esta inmunoglobulina reconoce el dominio III de EGFR y Fue aprobado por la Food and Drug Administración (FDA) el 12 de febrero de 2004 y por la European, Medicines, Agency (EMA) el 29 de junio de 2004 (Machado et al., 2006). Compete con los ligandos naturales de EGFR (EGF y TGF- $\alpha$  principalmente), con mayor afinidad que sus ligandos canónicos, bloqueando la activación del receptor y a su vez inhibiendo las cascadas de señalización que conducen a la proliferación celular, angiogénesis, metástasis y apoptosis que se producen de manera natural como consecuencia de la activación del receptor. Cuando ocurre el acoplamiento entre EGFR y Cetuximab se produce una dimerización mediada por el anticuerpo produciendo la internalización y posterior degradación del receptor en el interior de la célula (Hanck-Silva et al., 2020), además de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) (Yi et al., 2014). Entre los mecanismos de acción que presenta esta inmunoglobulina se encuentran la inhibición de la proliferación celular bloqueando el ciclo celular, aumentando los niveles de la proteína inhibidor de quinasas dependientes del ciclo p27kip1, deteniendo las células en fase G1, así como también la inhibición de la angiogénesis disminuyendo los factores pro-angiogénicos y apoptosis celular como se presenta en la figura 8.



### Figura 8. Mecanismos de acción de Cetuximab.

(A) Cetuximab presenta mayor afinidad que los ligandos canónicos de EGFR, (B) Cetuximab impide la unión de EGFR a otros miembros de la familia HER, (C) Cetuximab promueve la internalización y degradación de EGFR, (D) Arresto de ciclo celular en fase G1, (E) Disminución de factores pro-angiogénicos disminuyendo la angiogénesis, (F) Influencia en el balance de apoptosis y supervivencia celular, (G) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediado por cetuximab. Figura obtenida de Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab (Brand et al., 2011).

Cetuximab es bastante bien tolerado por los pacientes que reciben este tratamiento, sin embargo, pueden llegar a presentar algunos efectos adversos como acné, astenia, disnea y dolor abdominal, hasta el momento aún no se han asociado muertes a la administración de Cetuximab (Galizia et al., 2007).



**Figura 9. Representación gráfica del Mecanismo de acción de cetuximab en el receptor de factor de crecimiento epidérmico cuando se presenta en baja expresión o con mutaciones.** Tomado de Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: mechanisms and potential regimens of drug resistance (Li et al., 2020).

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico cuya conformación estructural consta de 3 unidades de tamaños equivalentes, los cuales poseen ciertas glicosilaciones que le permite poder diferenciarse de otros mAbs. Dos de estos son fragmentos de unión al antígeno (Fab) que están compuestos por una cadena variable ligera (VL) y una cadena variable pesada (VH) provenientes de una secuencia murina las cuales permiten la unión a la molécula por complementariedad, y una región cristalizadora (Fc) con funciones efectoras del anticuerpo al interactuar con su receptor. (Hanck-Silva et al., 2020). El isotipo IgG1 Fc fue escogido para mejorar la contribución de los efectos antitumorales.

Las subunidades de cadena ligera y cadena pesada contienen una y dos secuencias consenso para la glicosilación unida a N, respectivamente. El residuo N-terminal de la cadena

pesada se cicla como ácido piroglutámico. Hay 32 residuos de cisteína y, en consecuencia, 16 enlaces disulfuro potenciales por molécula (Galizia et al., 2007).

Las glicosilaciones son una de las modificaciones postraduccionales más importantes de las proteínas, tienen un papel esencial en la actividad terapéutica de los anticuerpos, dentro de las propiedades terapéuticas que confieren estas glicofomas se encuentra que influye en los mecanismos efectores, un tiempo de vida media más prolongado en el suero, así como algunas propiedades indeseadas como inmunogenicidad (Yi et al., 2014).

Cetuximab ha demostrado resultados positivos cuando es administrado como monoterapia, sin embargo también se ha propuesto el uso de este en terapias combinadas como en el caso del tratamiento de carcinoma hepatocelular (HCC) cuyas células parecen demostrar baja sensibilidad hacia este anticuerpo, en algunos casos se considera el uso combinado con otros mAbs como lo es en el caso de Trastuzumab o Dalotuzumab en el tratamiento de tumores que presentan resistencia a la monoterapia donde se ha demostrado mejores efectos debido a la activación del EGF (Xue et al., 2016).

### **2.2.5. Validación de métodos analíticos**

La validación de un método analítico tiene como finalidad poder demostrar que una determinada metodología es adecuada para llevar a cabo el propósito propuesto, donde se deberá de presentar toda la documentación necesaria que permita verificar toda la información relevante durante la validación, la cual proporciona toda la evidencia suficiente de que el método analítico cumple con los objetivos propuestos (*ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\_en.pdf*, s. f.).

### **2.3. Marco legal**

Este estudio fue ejecutado bajo los principios de buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de documentación y en apego a los lineamientos de trabajo de la UDIBI.

## **3. Diseño metodológico**

### **3.1 Tipo de investigación**

El tipo de investigación presente en este proyecto fue investigación aplicada , ya que se buscaba establecer y validar una metodología que permita evaluar la actividad biológica de productos que contengan como principio activo Cetuximab, con el fin de aplicarla en el análisis de posibles candidatos a bioterapéuticos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

### **3.2 Población y muestra**

Líneas celulares obtenidas de pacientes con cáncer de colon, cáncer de hígado y cáncer de mama.

### **3.3 Hipótesis**

La hipótesis inicial de este proyecto fue que la unión de Cetuximab al EGFR en la superficie de células cancerosas, inhibirá su crecimiento de manera dosis-dependiente.

### **3.4. Variables**

### **3.4.1 Dependientes**

- Número de células por pozo (Viabilidad)

### **3.4.2 Independientes**

- Tiempo de exposición al Cetuximab y tiempo de incubación en medios de cultivo.
- Concentración de Cetuximab

### **3.4.3 Intervinientes**

- Niveles de expresión del receptor EGFR

## **3.5. Fases de la investigación**

### **3.5.1 Revisión bibliográfica**

Se revisaron diferentes artículos científicos donde se evalúan el efecto inhibitorio del Cetuximab.

### **3.5.2. Selección líneas celulares**

Después de realizar la investigación previa se seleccionaron las líneas celulares que implementaron en otras investigaciones y aquellas con disponibilidad de banco trabajo en el banco de líneas celulares de la UDIBI.

### 3.5.3 Descongelación

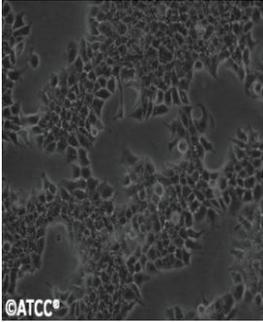
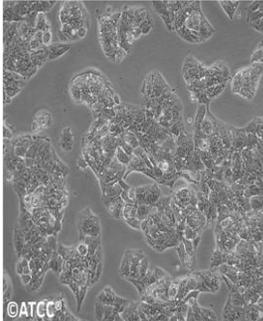
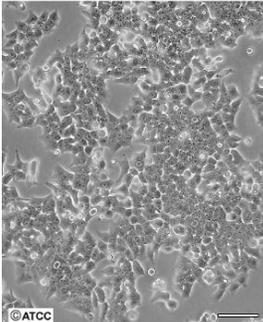
Línea	Medio de cultivo	Tipo de cáncer	Morfología de las
-------	------------------	----------------	-------------------

Las células se encuentran almacenadas con nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$  por lo cual es necesario realizar una descongelación según el procedimiento establecido para descongelar líneas celulares en el ATCC (*Microbiologics | Reference Strains for Microbiological QC Testing*, s. f.). y el documento U158-PNO edición B, el cual está lineado a lo indicado por la ATCC y fue establecido por parte de la UDIBI para manejo y almacenamiento de líneas celulares.

### 3.5.4 Expansión celular

Se incubaron las células a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  hasta obtener el número de células necesarias para el estudio, teniendo en cuenta el consumo del medio de cultivo y la cinética de crecimiento celular, adicionalmente se realizó monitoreo constante a las cajas con células utilizando un microscopio invertido para observar mejor su morfología celular. Las células HCT-116 presentaban una morfología en forma de huso (alargadas y redondas) y usualmente presentaban un patrón de crecimiento agrupado o en racimos, por otro lado, las HepG2 presentaban una estructura más circular con un crecimiento más uniforme de la monocapa celular, y finalmente, las BT-474 presentaban una forma circular y al igual que las HCT-116 presentaban un crecimiento en forma de racimos. Información adicional a estas líneas celulares se puede encontrar en la tabla 3 y la Figura 10.

**Tabla 3.** Medios de cultivos utilizados según la línea celular

celular			células
BT-474	Hybri-Care + 10% Suero fetal bovino + 1.5g/L bicarbonato de sodio	Esta línea celular se obtuvo de una mujer adulta blanca de 60 años con cáncer de mama ( <i>BT-474</i> / <i>ATCC</i> , s. f.).	 <p>©ATCC®</p>
HepG2	EMEM + 10% Suero fetal bovino	Se aisló de un paciente joven blanco de 15 años con carcinoma hepatocelular ( <i>hepatitis G2</i> [ <i>HEPG2</i> ] / <i>ATCC</i> , s. f.).	 <p>©ATCC®</p>
HCT-116	McCoy's 5A + 10% Suero fetal bovino	Línea celular aislada de un paciente adulto con cáncer de colon ( <i>HCT 116</i> / <i>ATCC</i> , s. f.).	 <p>©ATCC</p>

### 3.5.5 Estandarización del protocolo

Se realizaron ensayos para establecer las condiciones óptimas de concentración de Cetuximab, cantidad de células por pozo y tiempo de exposición del anticuerpo en las células, para establecer el protocolo ideal para evaluar la actividad antiproliferativa de cetuximab.

### **3.5.6 Inhibición de la proliferación celular**

Para evaluar la inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab se utilizó el kit CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (*CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Protocol*, s. f.), Para esto se tomaron las células previamente incubadas en su medio de cultivo correspondiente, suplementado con los nutrientes necesarios para su óptimo crecimiento y desarrollo. Los medios implementados fueron descritos anteriormente en la tabla 3.

Se sembraron las células en una placa de 96 pozos a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células/pozo en un volumen total de medio de 100  $\mu\text{L}$ , las células fueron evaluadas por duplicado en presencia de diferentes concentraciones de cetuximab en un intervalo de 1 – 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para poder determinar las concentraciones óptimas en la que se observa mejor el efecto inhibitorio, se dejaron en incubación a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 72 horas y 96 horas, finalizando el tiempo de incubación se les adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de MTS a cada pozo y se deja en incubación por 4 horas a las mismas condiciones. Se procede a medir la absorbancia a 490 nm y analizar los resultados obtenidos.

### **3.5.7 Validación del protocolo**

Para este protocolo se consideraron atributos de calidad como especificidad, exactitud y precisión.

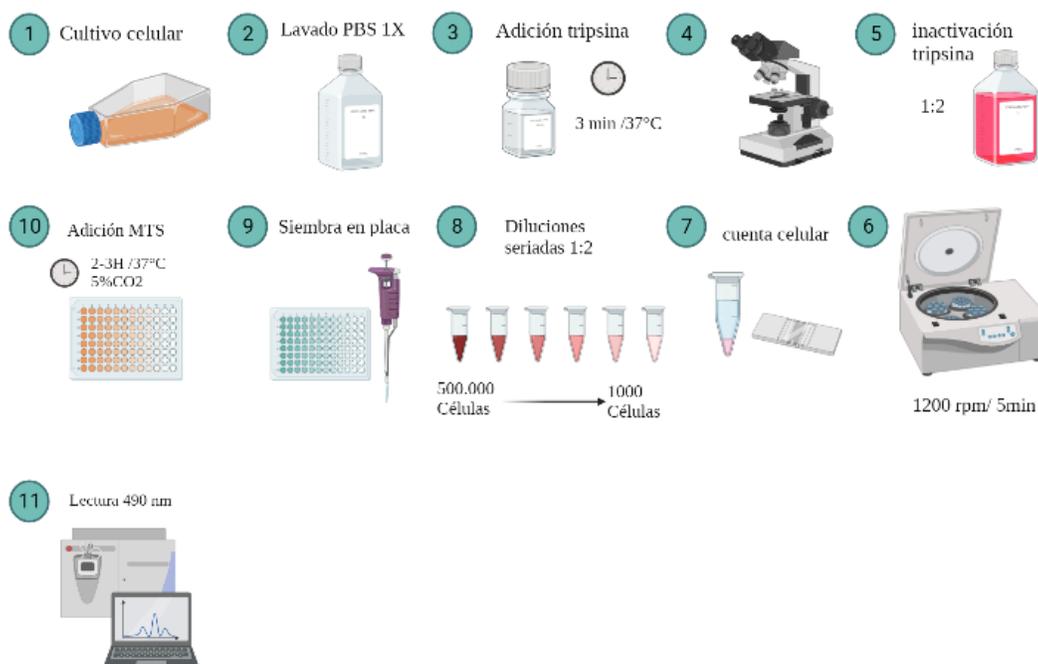
### **3.5.8 Técnicas de análisis**

Los datos crudos fueron obtenidos haciendo lecturas en el espectrofotómetro disponible en la UDIBI utilizando el software Softmax pro Gxp, el cual es una herramienta avanzada y confiable implementada en entornos regulados para la adquisición, análisis y gestión de datos de laboratorio, estos datos se trasladaron al programa Excel para ordenarlos mediante la generación de tablas de datos y posteriormente se analizaron con el software estadístico GraphPad prism el cual es un programa informático ampliamente utilizado en el ámbito científico y de la investigación para el análisis y la visualización de datos. Se destaca por su versatilidad y capacidad para realizar análisis estadísticos, generar gráficos de alta calidad y elaborar informes basados en datos experimentales.

## 4. Resultados y discusiones

### 4.1 Ensayos de proliferación celular

Como primera etapa se realizó un ensayo de proliferación celular utilizando las líneas celulares BT-474 y HCT-116, para poder establecer las condiciones óptimas donde se pudiera tener una señal de proliferación, esto se realizó utilizando el procedimiento de la **(Figura 10)**.



**Figura 10. Representación gráfica del procedimiento utilizado para llevar a cabo el ensayo de la proliferación celular.**

1. Se utilizaron las células previamente descongeladas y cultivadas en medio de cultivo McCoy's 5A + 10% Suero fetal bovino y Hybri-Care + 10% Suero fetal bovino + 1.5g/L bicarbonato de sodio para la línea celular HCT-116 y BT-474 respectivamente. Para

esto se revisó que las células cumplieran con los criterios de calidad morfológicos de acuerdo a la línea celular empleada y que estuviera libre de contaminaciones por microorganismos como bacterias o hongos.

2. Se retiró el medio de cultivo con ayuda de una pipeta serológica sin alterar la monocapa celular y se realizó un lavado con 5ml de PBS 1x previamente preparado para eliminar los residuos de medio y de suero fetal bovino.

3. Se adicionaron 2 ml de tripsina y se distribuyó por toda la caja de forma que cubriera por totalidad la monocapa celular, se dejó incubando por 3 min a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> para favorecer la actividad de la tripsina.

4. Pasado el tiempo de incubación se visualizó que las células estuvieran desprendidas de la pared de la caja y que no estuvieran estresadas por la adición de la tripsina visualizando su morfología celular.

5. Se adicionaron 4 ml de medio de cultivo suplementado, adecuado para cada línea celular para inactivar la tripsina en una relación 1:2.

6. Las células se recuperaron con una pipeta serológica estéril y se transfirieron a un tubo cónico y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min.

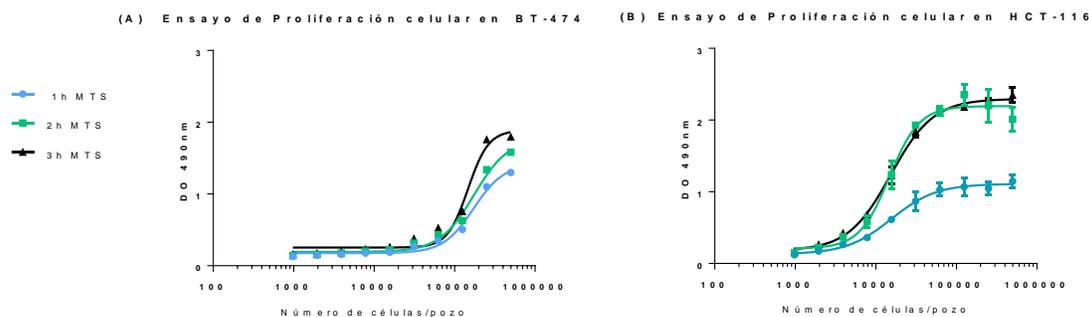
7. Se retiró el excedente de medio de cultivo y tripsina dejando solamente el botón celular, el cual se resuspendió adicionando medio de cultivo fresco acorde al tamaño del mismo. Se realizó una dilución 1:10 con azul tripano y se procedió a realizar el conteo celular en hemocitómetro como lo indica el procedimiento interno U017-INS para la cuenta células por el método de exclusión de azul tripano.

8. Se preparó una suspensión celular a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/Pozo a partir del cual se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta llegar a  $1 \times 10^4$  células/porozo.

9. Utilizando una placa de 96 pozos se sembraron las diluciones de las células por duplicado para HCT-116 y por cuatuplicado para BT-474, se dejaron incubando por 72 h 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

10. Pasado el tiempo de incubación de 72 horas, se adicionaron 20 µL de MTS en cada uno de los pozos con células, como blanco se utilizó medio de cultivo fresco que no contenía células.

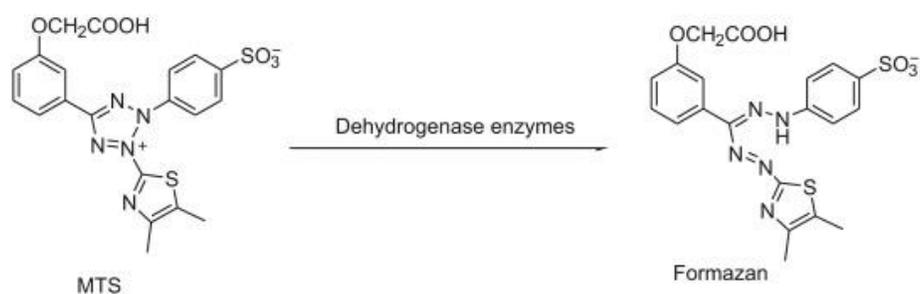
11. Se realizaron lecturas 1,2 y 3 horas después de adicionar el MTS para determinar la viabilidad celular y su proliferación utilizando un espectrofotómetro leyendo a una longitud de onda de 490nm donde se graficó la densidad óptica D.O contra el número de células, los resultados se muestran en la (**Figura 11**).



**Figura 11. Gráfico de proliferación celular utilizando la línea celular. Imagen (A) HCT-116 e imagen (B) BT-474.**

Se realizaron 3 lecturas en intervalos de 1 hora, es decir un total de tres lecturas, para esto se utilizó el CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS), el cual consiste en un método colorimétrico para determinar la viabilidad celular a través de la actividad metabólica de las células presentes en cada uno de los pozos evaluados, el cual se compone por un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES) y el 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), el cual es degradado por enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH producido en la mitocondria de células metabólicamente activas, el producto de esta degradación es formazan (Y. Wang et al., 2021), la reacción química de este proceso se muestra en la (**Figura 12**). La cantidad de formazan como producto de biodegradación es directamente proporcional a la actividad metabólica de células vivas presente en el medio.



**Figura 12. Degradación de MTS en formazan mediado por enzimas deshidrogenasas de células metabólicamente activas.**

Figura obtenida de “Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables” (Kuate et al., 2017).

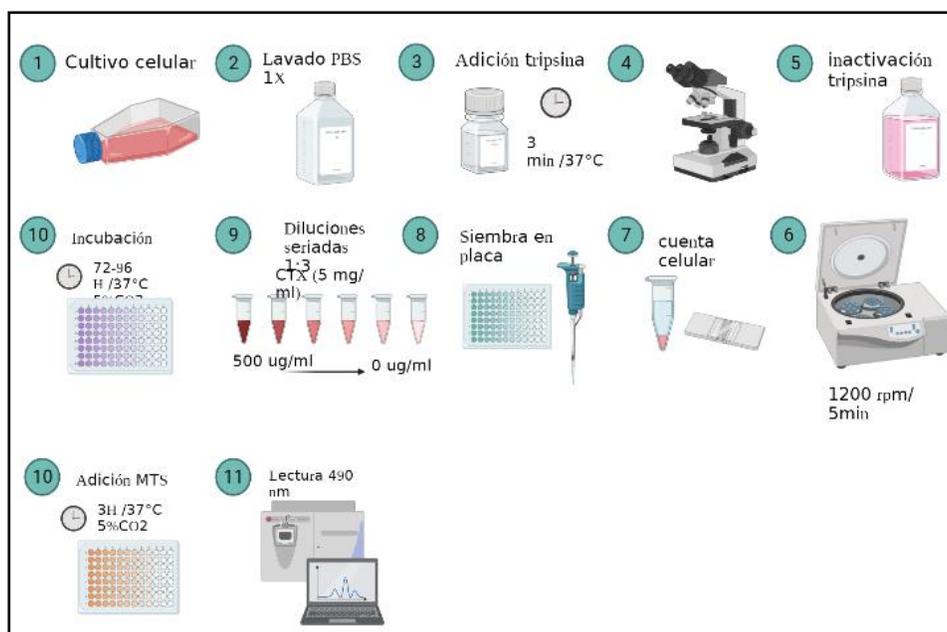
Este método de detección permitió conocer que las células se encontraban metabólicamente activas debido a la cantidad de formazan como producto de la reducción de MTS en cada una de las diferentes concentraciones de células/pozo evaluadas después de las 72 horas de incubación durante este experimento. De esta forma se pudo seleccionar un número de células por pozo donde estas puedan proliferar de forma adecuada y seguir siendo viables, donde los componentes nutricionales del medio no actuaran como una limitante y una variable que pudieran influir en los resultados de los próximos experimentos. El número de células seleccionado para los posteriores ensayos fue  $2.5 \times 10^5$  células por pozo. Además, se pudo

observar que la diferencia entre las lecturas después de la adición del MTS eran muy parecidas por lo que a partir de las 2 horas se puede considerar hacer la lectura con el espectrofotómetro sin que los resultados arrojaran resultados que pudieran afectar la confiabilidad del ensayo.

Los resultados obtenidos para la línea celular BT-474 no fueron satisfactorios debido a que se observaba mucha dispersión en los duplicados de los pozos con células, por lo que se consideró en realizar nuevamente el experimento por cuadruplicado para tener unos resultados que pudieran llegar a ser más relevantes y con mayor precisión, los resultados obtenidos permitieron establecer el número de células apropiado para poder evaluar la actividad antiproliferativa de Cetuximab.

#### 4.2 Ensayos de inhibición de la proliferación

Se evaluó la proliferación celular de las 3 líneas celulares (HepG2, HCT-116 Y BT-474) en presencia de diferentes concentraciones de Cetuximab, el procedimiento se describe a continuación y se muestra en la **(Figura 13)**.

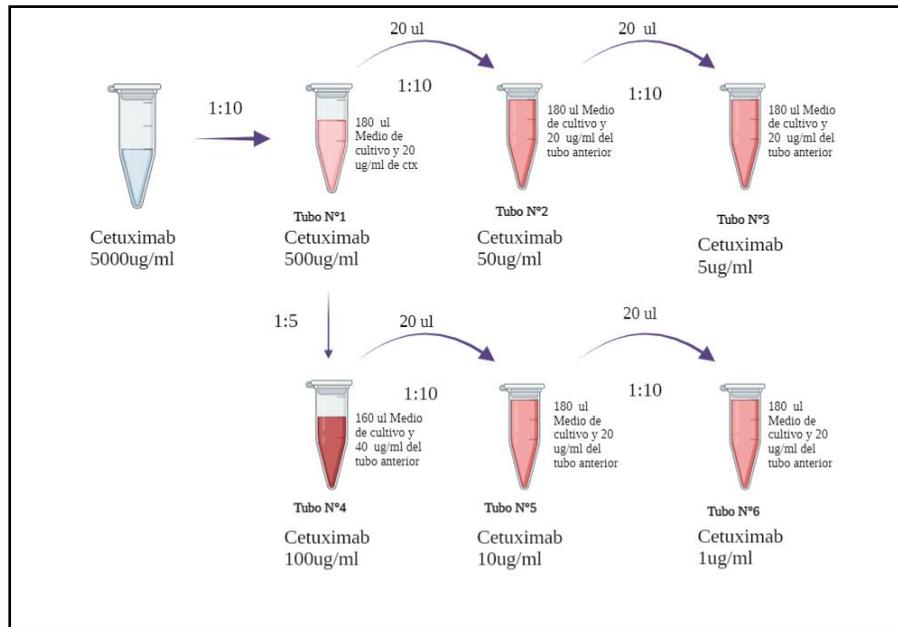


**Figura 13. Representación gráfica de la metodología establecida para llevar a cabo la inhibición de la proliferación.**

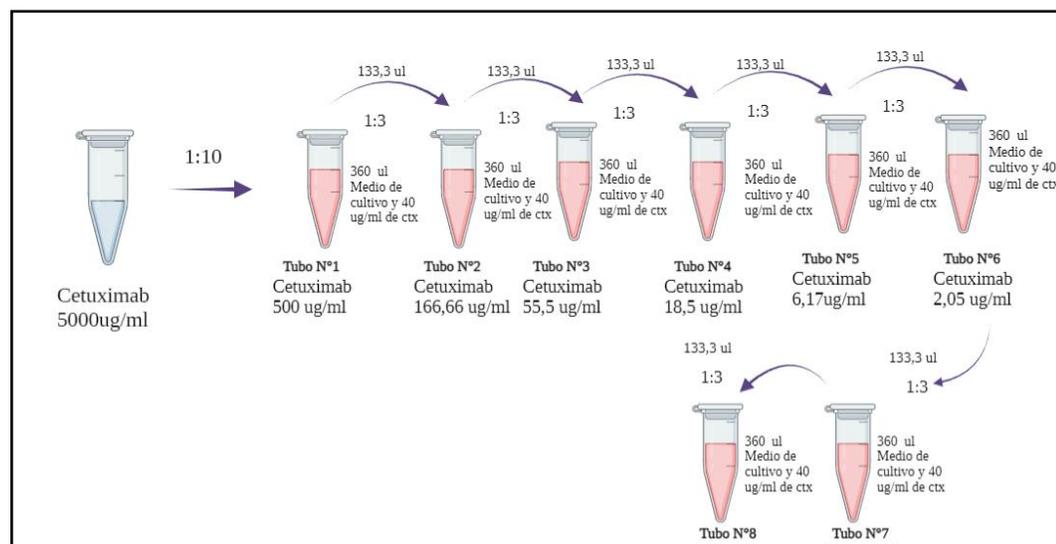
Para esta metodología se consideraron los aspectos mencionados anteriormente desde el paso 1 al 7 del ensayo de proliferación celular que se presenta en la sección 4.1 , una explicación más detallada de las demás etapas se encuentra descrita a continuación, los medios utilizados se mencionan en la tabla 3.

8. Finalizado el conteo celular se realizaron los cálculos correspondientes para adicionar 100  $\mu$ l con 250 mil células a cada uno de los pozos necesarios para el ensayo y sembrar en la placa.

9. Se prepararon diluciones del tratamiento de Cetuximab (CTX) el cual se encuentra a una concentración de 5mg/ml, se preparó una dilución inicial 1:10 del producto comercial, posteriormente se prepararon las demás diluciones de trabajo evaluadas en una relación de 1:10 y 1:5 para obtener un intervalo de concentración de 100,50,10,5,1  $\mu$ g/mL como se observa en la **(Figura 14)**. Para algunos ensayos se realizaron diluciones seriadas 1:3 a partir de la dilución previa 1:10 de la concentración de CTX 500 $\mu$ g/ml hasta 0.22 $\mu$ g/ml como se muestra en la **(Figura 15)**. Como control negativo se utilizó medio de cultivo con células sin tratamiento.



**Figura 14. Preparación de los tratamientos para obtener una concentración de Cetuximab entre 500µg/ml hasta 1µg/ml.**



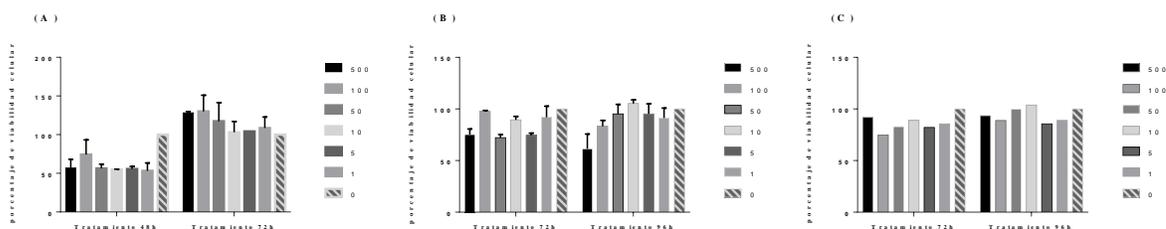
**Figura 15. Procedimiento para la preparación de tratamientos de Cetuximab mediante diluciones seriadas 1:3 partiendo de concentración de 500 µg/ml que se obtenía de una dilución previa 1:10 del anticuerpo comercial.**

10. Pasado el tiempo de incubación de 72-96 horas, se adicionó 20ul de MTS en cada uno de los pozos con células.

11. Se realizaron lecturas 1,2 y 3 horas después de adicionar el MTS para determinar la viabilidad celular y su proliferación utilizando un espectrofotómetro Spectramax leyendo a una longitud de onda de 490nm, los resultados se muestran en la **(Figura 16)** hasta la figura 20.

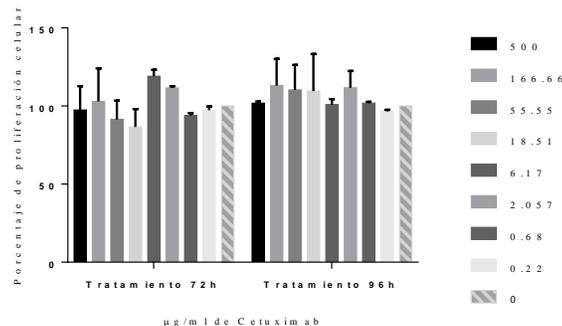
#### 4.2.1 Ensayos de inhibición de la proliferación usando línea celular HepG2

Durante este estudio se realizaron una serie de ensayos en la línea celular HepG2, la cual había sido reportada por otros investigadores en ensayos de inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab, una descripción más completa se puede evidenciar en la sección de antecedentes de este proyecto. Para todos los ensayos evaluados se realizaron diferentes diluciones a partir una concentración de 5mg/mL del anticuerpo, la cual corresponde a la concentración que tiene este anticuerpo en su presentación comercial, la preparación de los tratamientos se describió anteriormente, los resultados obtenidos para este ensayo se encuentran en la **(Figura 16 y 17)**.



**Figura 16. Porcentaje de viabilidad celular.**

Obtenido a partir de diferentes concentraciones de tratamientos con Cetuximab (1, 5, 10, 50, 100 y 500) µg/mL, la preparación fue descrita anteriormente. En el eje X se muestra los grupos evaluados a 48, 72 y 96 horas, en el eje Y se muestra el porcentaje de proliferación celular usando la línea celular HepG2.

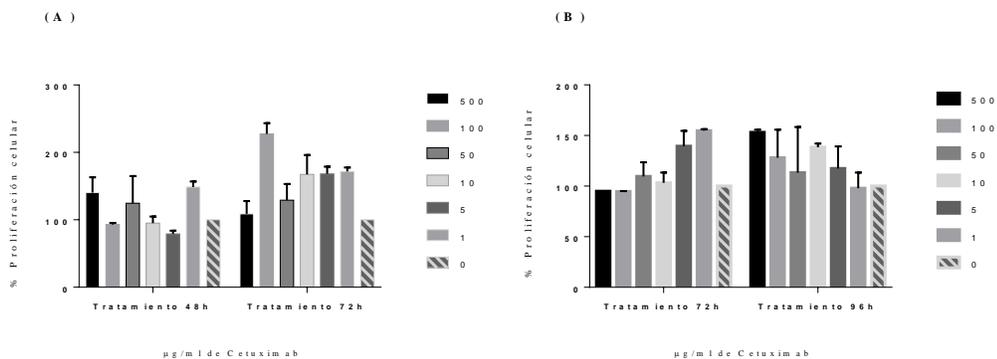


**Figura 17. Porcentaje de viabilidad celular.**

Evaluated at 72 and 96 hours, dilutions 1:3 were prepared from an initial concentration of 500 µg/mL to 0.22 µg/mL.

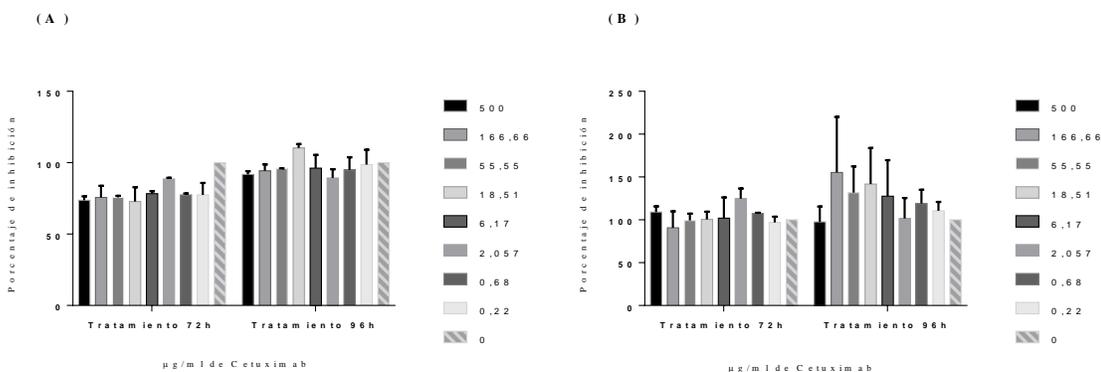
#### 4.2.2 Ensayos de inhibición de la proliferación mediada por Cetuximab utilizando la línea celular HCT-116.

For this assay, the aspects mentioned previously in the cell proliferation inhibition assays in HepG2 cells were considered. The results for the inhibition of cell proliferation evaluated in the HCT-116 cell line are found in (Figure 18 and 19).



**Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular.**

Obtenido a partir de diferentes concentraciones de tratamientos con Cetuximab evaluado a 48, 72 y 96 horas en células HCT-116.

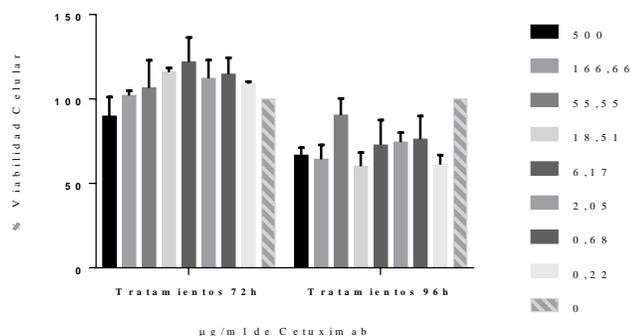


### Figura 19. Porcentaje de viabilidad celular.

Obtenido a partir de diferentes concentraciones de tratamientos con Cetuximab realizando diluciones 1:3 a partir de una concentración de 500 µg/mL hasta 0,22 µg/mL evaluado a 48, 72 y 96 horas en células HCT-116.

#### 4.2.3 Ensayos de inhibición de la proliferación mediada por Cetuximab utilizando la línea celular BT-474

Finalmente, se consideraron aspectos como la preparación de los tratamientos, número de células/pozo y tiempos de exposición como las evaluadas en las líneas celulares HepG2 y HCT-116. Los resultados obtenidos para esta línea celular se visualizan en la (Figura 20).



**Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular del ensayo de inhibición de la proliferación.** Mediada por Cetuximab a un tiempo de 72 horas y 96 horas a diferentes concentraciones del anticuerpo que van desde una concentración de 500µg/ml hasta 0,22 µg/ml en BT-474.

Como se muestra en las Figuras anteriores, se recopiló la información obtenida durante este estudio donde se evaluó la inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab en tres líneas celulares diferentes HepG2, HCT-116 y BT-474, para esta última línea celular solo se realizó un experimento debido a que se presentó un comportamiento similar a los obtenidos con las otras líneas celulares.

Durante la investigación realizada para la selección de las líneas celulares a implementar se pudo encontrar que en algunos de los ensayos donde evaluaban la capacidad de Cetuximab para inhibir la proliferación celular seguía un comportamiento de dosis respuesta. Según lo reportado por (Levy et al., 2009) la mayor actividad antiproliferativa de Cetuximab se observó a la máxima concentración (100 µg/mL) usando la línea celular HCT-116, por otro lado, otros investigadores determinaron que la concentración óptima de tratamiento para esta misma línea celular era de 8 µg/mL donde se observó una mayor inhibición del crecimiento celular de hasta un 50% con referencia al grupo control (Kumar et al., 2014), sin embargo, varios autores han reportado esta misma línea celular como resistente a las terapias con Cetuximab donde su

inhibición fue insignificante incluso a la concentración más alta del tratamiento (Jeoung et al., 2019). La línea celular BT-474 no siguió el comportamiento esperado a la exposición del tratamiento como lo reportado por Fu et al, 2018, donde reportaron un comportamiento dosis respuesta presentando una inhibición de hasta 50% en su concentración más alta de 100  $\mu\text{g/mL}$ . La línea celular HepG2 había sido reportada por no ser muy susceptible a la terapia dirigida por este anticuerpo, alcanzando una inhibición de tan solo un 20% al ser expuesta a una concentración de 2000  $\mu\text{g/mL}$  de cetuximab (Xue et al., 2016).

Las terapias que involucran Cetuximab como monoterapia han presentado dificultades para detener el crecimiento de las celular cancerígenas tanto *in vitro* como *in vivo*, dentro de las diferentes estrategias que han permitido mejorar la efectividad de las terapias de Cetuximab Se ha reportado el uso de nanopartículas de oro que mejoran el efecto de Cetuximab en cáncer de colon (Leve et al., 2019), la utilización ácido tetrayodotiroacético en combinación con Cetuximab (Lee et al., 2016), con Icaritin (Yin et al., 2020), terapia molecular de doble diana de PP242 (Kong et al., 2021), también su aplicación con radioterapias y quimioterapias (Dutta & Maity, 2007) y en terapias combinadas con otros anticuerpos como Trastuzumab el cual es un mAb anti-HER2 (Zheng et al., 2014) (Kawaguchi et al., 2007) (Yamazaki et al., 2012)

Es importante destacar que EGFR no es el único receptor que está involucrado en la proliferación celular, la familia de receptores de tirosinas quinasas (RTKs) como HER1, HER2, HER3 Y HER4 están involucrados en la proliferación, invasión, migración, sobrevivencia en muchos tipos de cáncer, principalmente en cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de ovario (Z. Wang, 2017). Se ha reportado que la sobreexpresión de tanto HER1 como HER2 favorece la heterodimerización de forma ligando-independiente entre estos receptores disminuyendo la actividad inhibitoria de las terapias dirigidas con anticuerpos hacia estas

moléculas, la combinación de Cetuximab y Trastuzumab evaluada *in vitro* e *in vivo* demostró tener una mayor eficiencia para inhibir el crecimiento de las células que si se aplica estos mAb como monoterapia, disminuyendo de forma significativa el tamaño del tumor inhibiendo la heterodimerización de EGFR/ErbB2 y su posterior activación y señalización (Zheng et al., 2014).

Como consecuencia de los resultados obtenidos se decidió hacer un análisis de los posibles factores que pudieron hacer influenciado durante el desarrollo de este experimento. Como ya se ha mencionado anteriormente, la actividad antiproliferativa de EGFR es mediada por la unión del fragmento Fab del mAb Cetuximab en el dominio III de EGFR. La resistencia de terapia dirigida hacia este receptor ha sido evidenciada por otros investigadores, entre los factores a los cuales se asocian esta resistencia se encuentran los siguientes:

### **1. Mutaciones EGFR y KRAS mutante**

Se ha reportado que las mutaciones estructurales en el dominio III de EGFR y mutaciones en el dominio de tirosina quinasas tienen altas implicaciones en la resistencia de terapias dirigidas hacia este receptor. Las mutaciones en genes involucrados en la señalización de EGFR son también uno de los factores conocidos que contribuyen a resistencia a Cetuximab, dentro de esas mutaciones se encuentra la mutación en la vía de señalización normal de KRAS que interfiere con la transmisión normal de este receptor, esta mutación ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer, principalmente en cáncer de colon, por lo que los fármacos activos como este mAb y Panitumumab tienen complicaciones presentando efectos limitados en la supervivencia de los pacientes, donde se estima que alrededor del 30-40% de las células cáncer de colon que presentan esta mutación y las terapias utilizando Cetuximab como único agente no serán efectivas (Lee et al., 2016), es por eso que esta mutación puede ser utilizado como biomarcador preventivo para determinar si la terapia utilizando Cetuximab puede llegar a ser

efectiva (Brand et al., 2011). El uso prolongado de terapias anti-EGFR puede conllevar al desarrollo de mutaciones de KRAS (Kong et al., 2021).

## **2. Vías de señalización alternas**

Se ha evidenciado que el efecto inhibitorio de Cetuximab se ve reducido en algunas líneas celulares que expresan el receptor EGFR, algunos estudios sugieren una vía de degradación alterna de EGFR mediada por la molécula de superficie CD44, esta glicoproteína de transmembrana no quinasa ha sido recientemente reportada en la atenuación de la degradación de EGFR mediante la endocitosis, de esta forma manteniendo las cascadas de señalización vía Akt (Fu et al., 2018). En este estudio demostraron la evidencia de que CD44 se internaliza a los compartimientos endosómicos bloqueando la translocación y degradación de EGFR mediada por Cetuximab en células de cáncer de mama resistentes a esta monoterapia. Al ocurrir la interacción entre esta inmunoglobulina con el receptor, este se internaliza para posterior degradación intracelular, dado a esto se puede llegar a ver disminuida la respuesta al tratamiento a elevadas concentraciones de Cetuximab producida por una saturación de la vía metabólica en el sistema (Galizia et al., 2007).

## **3. Translocación del receptor**

Frecuentemente EGFR es conocido como una glicoproteína que se encuentra presente en la membrana plasmática de la célula, sin embargo, este también puede estar localizado en el interior de la célula en organelos como la mitocondria, núcleo y vesículas del comportamiento endosomal. Se ha reportado que EGFR y EGFR III puede hacer un proceso de translocación hacia la mitocondria celular, de esta forma volviéndolos menos susceptibles a las terapias dirigidas hacia este receptor de forma extracelular y muerte celular, la translocación de EGFR al

núcleo está involucrado como factor de cootranscripción de genes involucrados en la proliferación celular, es por esto que la localización de este receptor puede tener alta importancia en la progresión del cáncer. (Talukdar et al., 2020). El aumento de EGFR en el núcleo está altamente relacionado con un mal pronóstico en cáncer de mama, cuyo niveles de expresión altos en esta molécula estaban relacionadas con la resistencia a Cetuximab, información que fue demostrada en un modelo in vitro donde se comprobaba la translocación de este receptor al núcleo como protección a esta inmunoglobulina (Li et al., 2009).

**Tabla 4.** Mecanismos de resistencia a Cetuximab.

Mecanismo de resistencia	Año	Líneas de células cancerosas	Enfoque científico	Mecanismo de resistencia a cetuximab
<b>Aumento de la degradación de EGFR</b>	2007	Cáncer de colon	Modelo de resistencia adquirida in vitro	- Las células resistentes tienen una mayor tasa de degradación de EGFR, lo que demuestra la importancia de los mecanismos alternativos para el crecimiento y la supervivencia.
<b>Desregulación de la internalización y degradación</b>	2008	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	Modelo de resistencia adquirida in vitro	- Las células resistentes tienen niveles elevados de EGFR debido a la degradación desregulada a través de la pérdida de unión a la

<b>de EGFR</b>		(NSCLC)		ubiquitina ligasa E3 c-Cbl
<b>Cambio oncogénico</b>	2008	NSCLC y Cáncer de cabeza y cuello (HNSCC)	Modelo de resistencia adquirida in vitro	- Las células resistentes tienen niveles de expresión aumentados de EGFR, HER2, HER3 y C-Met
				- EGFR ha aumentado la unión a estos receptores, lo que indica el papel de la heterodimerización en la resistencia
<b>Localización subcelular de EGFR</b>	2009	NSCLC	Modelo de resistencia adquirida de xenoinjertos in vitro e in vivo	- Las células resistentes tienen niveles aumentados de EGFR nuclear inducido por ligando
				- La inhibición de con el fármaco Dasatinib puede bloquear la localización nuclear de EGFR y volver a sensibilizar las células resistentes a cetuximab

	2009	Cáncer de mama y pulmón	Líneas celulares transfectadas de forma estable con MDGI cultivadas en matrigel 3D e in vivo	- La expresión de MDGI puede inducir la localización intracelular de EGFR, evitando que su capacidad se vea afectada por el tratamiento con cetuximab
<b>Activación constitutiva de moléculas efectoras de EGFR</b>	2010	NSCLC	Modelo de resistencia adquirida in vitro	La proteína Homóloga de fosfatasa y tensión (PTEN) se degrada en células resistentes a cetuximab, lo que lleva a la activación constitutiva de AKT
	2009	NSCLC	Modelo de resistencia adquirida in vitro	- Las células resistentes tienen una mayor actividad de las quinasas de la familia Src(SFK), lo que lleva a una mayor actividad de AKT - El inhibidor de SFK Dasatinib puede sensibilizar a las células resistentes a cetuximab al reducir la activación de SFK y AKT
	2010	Cáncer de colon	Modelado in vitro e in vivo de líneas	- Las células mutantes KRAS CRC han aumentado la

		(CRC)	celulares tumoraes con KRAS mutado	activación de SFK  - La inhibición de las SFK puede sensibilizar a los mutantes de KRAS a Cetuximab in vitro e in vivo al disminuir la señalización a través de las vías MAPK, B-catenina y STAT
<b>Aumento de la expresión de los factores de crecimiento de la familia HER</b>	2010	HNSCC	- Uso de líneas celulares resistentes y sensibles a cetuximab publicadas anteriormente.	-Las líneas celulares resistentes tienen una mayor expresión del ligando Heparin Binding (HB-EGF) debido a una disminución del microRNA 212 (miR-212)
			- Examen de muestras de tumores y muestras de plasma de pacientes	- Los pacientes con tumores recurrentes tienen una mayor secreción y expresión del ligando HB-EGF

NSCLC: Cáncer de pulmón de células no pequeñas, HNSCC: Cáncer de cabeza y cuello, CRC: Cáncer colorrectal, SFK: quinasas de la familia S-rc, PTEN: proteína Homóloga de fosfatasa y tensión, HB-EGF: Heparin Binding-EGF

Debido a la resistencia presentada por células cancerígenas a las monoterapias usando Cetuximab, muchos investigadores han sugerido el uso de terapias combinadas de cetuximab con otros mAbs como lo es en el caso de anticuerpos dirigidos hacia el receptor de muerte programada-1 (PD-1), mejorando la supervivencia de los pacientes con este tipo de enfermedad mostrando buenos efectos antitumorales en las células tumorales (Kong et al., 2021), así como inhibidores de quinasas, terapias alternativas como la quimioterapia o radioterapia para el tratamiento del cáncer, esto se sustenta debido a que Gefitinib y la inmunoglobulina C225 debido a que mejoran la respuesta de estas células malignas a la radiación. Como ya se ha mencionado anteriormente Cetuximab bloquea el ciclo celular aumentando las células presentes en fase G1, etapa en la cual estas células son más radiosensibles, simultáneamente de esta forma disminuye el número de células en el estadio del ciclo celular S donde son menos sensibles a esta terapia (Dutta & Maity, 2007).

La reparación de ADN después de someterse a radiación esta disminuido por el uso de Cetuximab, de la misma forma se han demostrado efectos apoptóticos inducidos por radioterapia, la inhibición de EGFR mediado por cetuximab disminuye los niveles de proteínas anti apoptóticas como Bcl-2 y aumenta los niveles de Bax, una proteína pro apoptótica (S. M. Huang et al., 1999). Por otro lado, también puede mejorar la eficacia de la quimioterapia al hacer las células más quimiosensibles por la supresión de la reparación del ADN, por lo que los inhibidores de EGFR podrían aumentar la muerte celular producida por la quimioterapia (Dutta & Maity, 2007). Recientes reportes han dejado en manifiesto que Cetuximab no es efectivo en

administración como solo agente, recomendando su uso con FOLFIRI y FOLFOX, ambos siendo compuestos químicos utilizados en algunas quimioterapias que actúan inhibiendo la síntesis de DNA y formación de microtúbulos (Jeoung et al., 2019). Sin embargo, al igual que la administración como monoterapia de Cetuximab puede tener efectos adversos en estudios clínicos, la administración de este anticuerpo en combinación con quimioterapia también ha reportado pacientes con diarrea, leucopenia y astenia principalmente (Galizia et al., 2007).

#### **4.3. Validación de la metodología.**

En el estudio realizado se estableció como objetivo obtener una metodología validada que permitiera evaluar la inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab, la importancia de una metodología validada radica en que es crucial para garantizar la confiabilidad del método propuesto, así como la seguridad y la calidad de los resultados.

Durante la validación, es importante tener en cuenta ciertas características de acuerdo con las pautas establecidas por el International Council for Harmonisation (ICH). Estas características incluyen evaluar la especificidad de la molécula hacia su objetivo, lo cual implica examinar la capacidad del anticuerpo para reconocer y unirse selectivamente a la molécula objetivo en presencia de moléculas relacionadas. También se debe considerar la selectividad de la metodología para detectar y distinguir el analito de interés en presencia de otros componentes de la matriz que no son específicos. Además, la exactitud y la precisión son parámetros esenciales que deben evaluarse durante la validación.

Como parte de la estandarización de la metodología se realizaron los diferentes experimentos descritos anteriormente en la sección 4.1 y 4.2 de este documento. Para evaluar el efecto antiproliferativo inducido por los diferentes compuestos utilizados en los estudios *in vitro*

se debe de considerar que estos sean sensibles y reproducibles (Pablo Maiso, 2012), una forma de determinar la reproducibilidad es calculando el coeficiente de variación (CV), el cual se utiliza en ensayos in vitro para determinar la variabilidad de los resultados. Para asegurar la confiabilidad de los experimentos, se consideró que el rango aceptable de coeficiente de variación debería ser menor al 25% con base en la información proporcionada en el bioanalytical method validation and study sample analysis (ICH HARMONISED GUIDELINE,2022). La variabilidad observada plantea preocupaciones en términos de la validez y confiabilidad del método analítico in vitro para inhibir la proliferación celular.

Es esencial identificar las posibles fuentes de variabilidad en el método analítico y revisar los parámetros críticos del método, como el tiempo de incubación, la concentración del anticuerpo y el número de células por pozo, ya que, pequeños cambios en estas condiciones pueden tener un impacto significativo en la variabilidad de los resultados.

Por otro lado, los resultados no se encuentran dentro de los límites establecidos para la repetibilidad y reproducibilidad por lo que se debe evaluar si es posible mejorar estos parámetros. Se pueden llevar a cabo estudios adicionales para evaluar la variabilidad intraoperador e interoperador. Un mayor número de replicaciones, más allá de los duplicados y cuadruplicados utilizados en este estudio, y el empleo de análisis estadísticos adecuados, como el cálculo del coeficiente de variación, pueden proporcionar una mejor estimación de la variabilidad y generar mayor confianza en los resultados. Es importante evaluar la consistencia y estabilidad del método mediante estos análisis.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la inhibición de la proliferación por CTX en este estudio no siguió un comportamiento dosis-dependiente al analizar las concentraciones más altas y más bajas de los experimentos. Para obtener la validación de una metodología se requiere

que los resultados cumplan con ciertos atributos como los mencionados en el apartado de validación de métodos analíticos como la especificidad, reproducibilidad, exactitud y precisión del experimento, los resultados obtenidos aquí no cumplieron con estos atributos por lo que no se pudo obtener la validación de esta metodología.

### **Conclusión**

Se estableció una metodología que permite evaluar la inhibición de la proliferación celular mediada por Cetuximab, sin embargo, no se pudo obtener una validación debido a que los resultados presentaban variabilidad entre las repeticiones de los ensayos y por el tamaño de respuesta obtenido en las diferentes concentraciones del anticuerpo evaluadas.

### **Recomendación**

Se recomienda evaluar la actividad antiproliferativa de Cetuximab en la línea celular A431, la cual ha sido reportada por varios investigadores que se observa una gran actividad inhibitoria por parte de este anticuerpo monoclonal y de esta forma poder establecer de forma más detallada una metodología que permita inhibir la proliferación celular in vitro en células resistentes al uso de este anticuerpo.

## Bibliografía

1. Aguilón G, J. C., Contreras L, J., Dotte G, A., Cruzat C, A., Catalán M, D., Salazar A, L., Molina S, M. C., Guerrero P, J., López N, M., Soto S, L., Salazar-Onfray, F., & Cuchacovich T, M. (2003). Nuevas armas inmunológicas para la medicina del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. *Revista médica de Chile*, 131(12), 1445-1453. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872003001200013>
2. Anticuerpos terapéuticos. (2016, marzo 10). *IBIAN Technologies*. <https://www.ibiantech.com/anticuerpos-terapeuticos/>
3. *Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US*. (s. f.). The Antibody Society. Recuperado 21 de abril de 2023, de <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/>
4. *Anticuerpos monoclonales: El revolucionario descubrimiento de César Milstein* » CAEME. (2019, septiembre 9). <https://www.caeme.org.ar/anticuerpos-monoclonales-el-revolucionario-descubrimiento-de-cesar-milstein/>
5. Brand, T. M., Iida, M., & Wheeler, D. L. (2011). Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biology & Therapy*, 11(9), 777-792. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.9.15050>
6. *BT-474* / ATCC. (s. f.). Recuperado 18 de octubre de 2023, de <https://www.atcc.org/products/htb-20>
7. *Cáncer*. (s. f.). Recuperado 10 de octubre de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

8. *CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Protocol*. (s. f.). Recuperado 6 de diciembre de 2022, de <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-nonradioactive-cell-proliferation-assay-protocol/>
9. Creus, N., Massó, J., Codina, C., & Ribas, J. (2002). *Anticuerpos monoclonales en Oncología*. 26, 16.
10. Crosby, D., Bhatia, S., Brindle, K. M., Coussens, L. M., Dive, C., Emberton, M., Esener, S., Fitzgerald, R. C., Gambhir, S. S., Kuhn, P., Rebbeck, T. R., & Balasubramanian, S. (2022). Early detection of cancer. *Science*, 375(6586), eaay9040. <https://doi.org/10.1126/science.aay9040>
11. Dutta, P. R., & Maity, A. (2007). Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer letters*, 254(2), 165-177. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.02.006>
12. Fu, W., Sun, H., Zhao, Y., Chen, M., Yang, L., Yang, X., & Jin, W. (2018). Targeted delivery of CD44s-siRNA by ScFv overcomes de novo resistance to cetuximab in triple negative breast cancer. *Molecular Immunology*, 99, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.010>
13. Galizia, G., Lieto, E., De Vita, F., Orditura, M., Castellano, P., Troiani, T., Imperatore, V., & Ciardiello, F. (2007). Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene*, 26(25), 3654-3660. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210381>

14. Gan, H. K., Cvrljevic, A. N., & Johns, T. G. (2013). The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): Where wild things are altered. *The FEBS Journal*, 280(21), 5350-5370. <https://doi.org/10.1111/febs.12393>
15. García Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 26(5), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
16. Hanck-Silva, G., Fatori Trevizan, L. N., Petrilli, R., de Lima, F. T., Eloy, J. O., & Chorilli, M. (2020). A Critical Review of Properties and Analytical/Bioanalytical Methods for Characterization of Cetuximab. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(2), 125-135. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1581984>
17. *HCT 116* / ATCC. (s. f.). Recuperado 18 de octubre de 2022, de <https://www.atcc.org/products/ccl-247>
18. *Hepatitis G2 [HEPG2]* / ATCC. (s. f.). Recuperado 18 de octubre de 2022, de <https://www.atcc.org/products/hb-8065>
19. Huang, S. M., Bock, J. M., & Harari, P. M. (1999). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Research*, 59(8), 1935-1940.
20. Huang, Y., Ognjenovic, J., Karandur, D., Miller, K., Merk, A., Subramaniam, S., & Kuriyan, J. (2021). A molecular mechanism for the generation of ligand-dependent differential outputs by the epidermal growth factor receptor. *eLife*, 10, e73218. <https://doi.org/10.7554/eLife.73218>
21. *Immune system* / *Description, Function, & Facts* / *Britannica*. (2023, febrero 23). <https://www.britannica.com/science/immune-system>

22. *Ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\_en.pdf*. (s. f.). Recuperado 17 de enero de 2023, de [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf)
23. Jeoung, M. H., Kim, T.-K., Kim, J. W., Cho, Y. B., Na, H. J., Yoo, B. C., Shim, H., Song, D.-K., Heo, K., & Lee, S. (2019). Antibody-Based Targeting of Cell Surface GRP94 Specifically Inhibits Cetuximab-Resistant Colorectal Cancer Growth. *Biomolecules*, 9(11), 681. <https://doi.org/10.3390/biom9110681>
24. Kattia, B. C., Hidalgo Carrillo, Gabriela, Mora Mata, Raquel, Rodríguez Mora, Ysmael-Acle Sánchez, & Mora Román, Juan José. (2019). *ANTICUERPOS MONOCLONALES BIESPECÍFICOS: DESARROLLO, PRODUCCIÓN Y ANTICANCERÍGENA*.
25. Kawaguchi, Y., Kono, K., Mimura, K., Mitsui, F., Sugai, H., Akaike, H., & Fujii, H. (2007). Targeting EGFR and HER-2 with cetuximab- and trastuzumab-mediated immunotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 97(4), 494-501. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603885>
26. Kong, L., Zhang, Q., Mao, J., Cheng, L., Shi, X., Yu, L., Hu, J., Yang, M., Li, L., Liu, B.-R., & Qian, X. (2021). A dual-targeted molecular therapy of PP242 and cetuximab plays an anti-tumor effect through EGFR downstream signaling pathways in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12. <https://doi.org/10.21037/jgo-21-467>
27. Krieghoff-Henning, E., Folkerts, J., Penzkofer, A., & Weg-Remers, S. (2017). Cancer – an overview. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, 40(2), 48-54.
28. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Chapter 10—Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. En V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and*

- Vegetables from Africa* (pp. 271-297). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8>
29. Kumar, S. S., Price, T. J., Mohiyeldin, O., Borg, M., Townsend, A., & Hardingham, J. E. (2014). KRAS G13D Mutation and Sensitivity to Cetuximab or Panitumumab in a Colorectal Cancer Cell Line Model. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, 7(1), 23-26.
30. Laustsen, A. H., Greiff, V., Karatt-Vellatt, A., Muyltermans, S., & Jenkins, T. P. (2021). Animal Immunization, in Vitro Display Technologies, and Machine Learning for Antibody Discovery. *Trends in Biotechnology*, 39(12), 1263-1273. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.03.003>
31. Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., & Dahiyat, B. I. (2006). Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(11), 4005-4010. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508123103>
32. Lee, Y.-S., Chin, Y.-T., Yang, Y.-C. S. H., Wei, P.-L., Wu, H.-C., Shih, A., Lu, Y.-T., Pedersen, J. Z., Incerpi, S., Liu, L. F., Lin, H.-Y., & Davis, P. J. (2016). The combination of tetraiodothyroacetic acid and cetuximab inhibits cell proliferation in colorectal cancers with different K-ras status. *Steroids*, 111, 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.03.006>
33. Leve, F., Bonfim, D. P., Fontes, G., & Morgado-Díaz, J. A. (2019). Gold nanoparticles regulate tight junctions and improve cetuximab effect in colon cancer cells. *Nanomedicine (London, England)*, 14(12), 1565-1578. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0023>
34. Levy, E. M., Sycz, G., Arriaga, J. M., Barrio, M. M., von Eeuw, E. M., Morales, S. B., González, M., Mordoh, J., & Bianchini, M. (2009). Cetuximab-mediated cellular cytotoxicity

- is inhibited by HLA-E membrane expression in colon cancer cells. *Innate Immunity*, 15(2), 91-100. <https://doi.org/10.1177/1753425908101404>
35. Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J., & Wheeler, D. L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene*, 28(43), 3801-3813. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.234>
36. Li, Q.-H., Wang, Y.-Z., Tu, J., Liu, C.-W., Yuan, Y.-J., Lin, R., He, W.-L., Cai, S.-R., He, Y.-L., & Ye, J.-N. (2020). Anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: Mechanisms and potential regimens of drug resistance. *Gastroenterology Report*, 8(3), 179-191. <https://doi.org/10.1093/gastro/goaa026>
37. Liu, J. K. H. (2014). The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Annals of Medicine and Surgery*, 3(4), 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>
38. Luca, T., Barresi, V., Privitera, G., Musso, N., Caruso, M., Condorelli, D. F., & Castorina, S. (2014). In vitro combined treatment with cetuximab and trastuzumab inhibits growth of colon cancer cells. *Cell Proliferation*, 47(5), 435-447. <https://doi.org/10.1111/cpr.12125>
39. Machado, N. P., Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2006). Anticuerpos monoclonales: Desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Infectio*, 10(3), 186-197.
40. *Microbiologics* | *Reference Strains for Microbiological QC Testing*. (s. f.). Recuperado 15 de septiembre de 2022, de [https://www.microbiologics.com/?gclid=Cj0KCQjwmPSSBhCNARIsAH3cYgaF-f\\_fnsnNX9pPZWSwuIKD3mbKFYD6wQlMYDuqXzFg1H2mk8c0tZkaAp7hEALw\\_wcB](https://www.microbiologics.com/?gclid=Cj0KCQjwmPSSBhCNARIsAH3cYgaF-f_fnsnNX9pPZWSwuIKD3mbKFYD6wQlMYDuqXzFg1H2mk8c0tZkaAp7hEALw_wcB)

41. *Monoclonal Antibodies (mAb): Harvesting, Types, Applications* • *Microbe Online*. (2019, septiembre 26). Microbe Online. <https://microbeonline.com/monoclonal-antibodies-types-and-applications/>
42. Okada, Y., Miyamoto, H., Goji, T., & Takayama, T. (2014). Biomarkers for Predicting the Efficacy of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibody in the Treatment of Colorectal Cancer. *Digestion*, 89(1), 18-23. <https://doi.org/10.1159/000356202>
43. Pablo Maiso, L. de. (2012). *Evaluación de la respuesta antiproliferativa en cáncer colorrectal del oxaliplatino en monoterapia y en combinación*. <https://academic.e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/5583>
44. Papini, F., Sundaresan, J., Leonetti, A., Tiseo, M., Rolfo, C., Peters, G. J., & Giovannetti, E. (2021). Hype or hope – Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 166, 103454. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103454>
45. Parra-Soto, S., Petermann-Rocha, F., Martínez-Sanguinetti, M. A., Leiva-Ordeñez, A. M., Troncoso-Pantoja, C., Ulloa, N., Diaz-Martínez, X., Celis-Morales, C., Parra-Soto, S., Petermann-Rocha, F., Martínez-Sanguinetti, M. A., Leiva-Ordeñez, A. M., Troncoso-Pantoja, C., Ulloa, N., Diaz-Martínez, X., & Celis-Morales, C. (2020). Cáncer en Chile y en

- el mundo: Una mirada actual y su futuro escenario epidemiológico. *Revista médica de Chile*, 148(10), 1489-1495. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872020001001489>
46. Pérez-Loyola, M., Valdés-González, M., & Garrido, G. (s. f.). *Modified pectins with activity against colon cancer: A systematic review from 2010-2021*. 36.
47. Ramos-Bello, D., & Llorente, L. (2009). Cincuentenario del descubrimiento de la estructura química de los anticuerpos. *Reumatología Clínica*, 5(6), 280-284. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2009.05.004>
48. Quienes Somos. (s. f.). *UDIBI*. Recuperado 21 de septiembre de 2022, de <https://udibi.com.mx/quienes-somos/>
49. Saltz, L. B., Meropol, N. J., Loehrer, P. J., Needle, M. N., Kopit, J., & Mayer, R. J. (2004). Phase II Trial of Cetuximab in Patients With Refractory Colorectal Cancer That Expresses the Epidermal Growth Factor Receptor. *Journal of Clinical Oncology*, 22(7), 1201-1208. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.182>
50. Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity*, 12, 14.
51. Talukdar, S., Emdad, L., Das, S. K., & Fisher, P. B. (2020). EGFR: An essential receptor tyrosine kinase-regulator of cancer stem cells. *Advances in Cancer Research*, 147, 161-188. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.04.003>
52. Valverde, A., Peñarando, J., Cañas, A., López-Sánchez, L. M., Conde, F., Guil-Luna, S., Hernández, V., Villar, C., Morales-Estévez, C., de la Haba-Rodríguez, J., Arand o, E., & Rodríguez-Ariza, A. (2017). The addition of celecoxib improves the antitumor effect of cetuximab in colorectal cancer: Role of EGFR-RAS-FOXM1- $\beta$ -catenin signaling axis. *Oncotarget*, 8(13), 21754-21769. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15567>

53. Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., & Tonini, G. (2008). The biological properties of cetuximab. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 68(2), 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.07.006>
54. Wang, Y., Nguyen, D. T., Yang, G., Anesi, J., Kelly, J., Chai, Z., Ahmady, F., Charchar, F., & Golledge, J. (2021). A Modified MTS Proliferation Assay for Suspended Cells to Avoid the Interference by Hydralazine and  $\beta$ -Mercaptoethanol. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 19(3), 184-190. <https://doi.org/10.1089/adt.2020.1027>
55. Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1652, 3-35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7219-7_1)
56. Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>
57. Xu, H., Yu, Y., Marciniak, D., Rishi, A. K., Sarkar, F. H., Kucuk, O., & Majumdar, A. P. N. (2005). Epidermal growth factor receptor (EGFR)-related protein inhibits multiple members of the EGFR family in colon and breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(3), 435-442. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0280>
58. Xue, F., Liu, Y., Chu, H., Wen, Y., Yan, L., Tang, Q., Xiao, E., Zhang, D., & Zhang, H. (2016). EIF5A2 is an alternative pathway for cell proliferation in cetuximab-treated epithelial hepatocellular carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 8(11), 4670-4681.
59. Yamazaki, M., Yamashita, Y., Kubo, N., Yashiro, M., Ohira, M., Ako, E., Tanaka, H., Muguruma, K., Sawada, T., & Hirakawa, K. (2012). Concurrent biological targeting therapy

- of squamous cell carcinoma of the esophagus with cetuximab and trastuzumab. *Oncology Reports*, 28(1), 49-54. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1803>
60. Yi, C., Ruan, C., Wang, H., Xu, X., Zhao, Y., Fang, M., Ji, J., Gu, X., & Gao, C. (2014). Function characterization of a glyco-engineered anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(11), 1439-1446. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.77>
61. Yin, L., Qi, X.-W., Liu, X.-Z., Yang, Z.-Y., Cai, R.-L., Cui, H.-J., Chen, L., & Yu, S.-C. (2020). Icaritin enhances the efficacy of cetuximab against triple-negative breast cancer cells. *Oncology Letters*, 19(6), 3950-3958. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11496>
62. Zheng, L., Tan, W., Zhang, J., Yuan, D., Yang, J., & Liu, H. (2014). Combining trastuzumab and cetuximab combats trastuzumab-resistant gastric cancer by effective inhibition of EGFR/ErbB2 heterodimerization and signaling. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 63(6), 581-586. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1541-z>