



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**GRADO EN MEDICINA**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**UTILIZACIÓN DE LOS ANTICUERPOS  
MONOCLONALES COMO TERAPIA EN EL  
CÁNCER**

**USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN CANCER  
THERAPY**

**Autor: Dña. Itziar Ostolaza Tazón**

**Directora: Dña. Blanca Sánchez Santiago**

**Santander, Junio 2016**

# ÍNDICE

---

## RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1 ¿Qué es el cáncer? .....	4
1.2 Componentes del tumor .....	4
1.3 Características biológicas .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	8
<b>3. ENFOQUE TERAPÉUTICO</b> .....	9
3.1 Terapias citotóxicas versus terapias dirigidas .....	9
<b>4. LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES</b> .....	10
4.1 Generalidades .....	10
4.1.1 Producción de anticuerpos .....	14
4.1.2 Nomenclatura .....	16
4.1.3 Aplicaciones .....	17
4.2 Acs. Frente a células tumorales .....	18
4.2.1 El Modelo HER .....	18
4.2.1.1 Cetuximab .....	20
4.2.1.2 Panitumumab .....	21
4.2.1.3 Necitumumab .....	22
4.2.1.4 Trastuzumab .....	23
4.2.1.5 Pertuzumab .....	25
4.3 Acs. Anti-estroma .....	26
4.3.1 Diana ósea .....	26
4.3.1.1 Denosumab .....	26
4.3.2 Diana vascular .....	28
4.3.2.1 Bevacizumab .....	29
4.3.2.2 Ramurizumab .....	30
4.4 Acs que modifican el sistema inmune del huésped .....	31
4.4.1 Diana CD20 .....	33

4.4.1.1 Rituximab .....	34
4.4.1.2 Ofatumumab .....	34
4.4.1.3 Ofatumumab .....	35
4.4.2 Diana CTLA 4 .....	36
4.4.2.1 Ipilimumab .....	36
4.4.3 Diana PD1 .....	36
4.4.3.1 Nivolumab .....	37
4.4.3.2 Pembrolizumab .....	37
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
5.1 Enfoques futuros .....	39

## **BIBLIOGRAFÍA**

# RESUMEN

---

El descubrimiento de las terapias antitumorales dirigidas y su relativamente reciente introducción en el ámbito clínico ha conseguido revolucionar el tratamiento de patologías muy prevalentes actualmente como son las enfermedades neoplásicas. Han abierto un gran campo de investigación en su tratamiento, siendo la piedra angular de este desarrollo terapéutico los anticuerpos monoclonales.

Gracias al, cada vez mayor, conocimiento que estamos adquiriendo sobre las características biológicas del cáncer, estamos consiguiendo una base muy sólida para el desarrollo de muy prometedoras dianas que nos permiten alcanzar un mayor control inhibiendo el desarrollo de esta enfermedad.

A pesar de tener una historia relativamente corta, su campo de aplicación ha crecido exponencialmente estando actualmente en diversas fases de investigación, no solo en oncología, sino en todas las disciplinas médicas conocidas.

**Palabras clave:** terapias dirigidas, fármaco biológico, anticuerpos monoclonales, dianas antineoplásicas.

The discovery of targeted cancer therapies and its relatively recent introduction in the clinical setting, has revolutionized the treatment of highly prevalent pathologies currently as neoplastic diseases. They have opened a large field of research in their treatment. The cornerstone of this therapeutic development are the monoclonal antibodies.

Thanks to the increasing knowledge we are acquiring about the biological characteristics of cancer, we are getting a very solid foundation for the development of promising targets that allow us to achieve greater inhibiting control in the development of this disease.

Despite of having a relatively short history, its scope has grown exponentially, being in various stages of research, not only in oncology, but in all known medical disciplines.

**Keywords:** targeted therapies, biologic drug, monoclonal antibodies, antineoplastic targets.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 ¿QUÉ ES EL CÁNCER?

Acorde a la Sociedad Española de Oncología Médica (1) el cáncer se define como un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo.

Las células normales adquieren la capacidad de multiplicarse descontroladamente por una alteración de los mecanismos de control. La célula se “olvida” de su capacidad de morir, originando los tumores, que sustituyen y destruyen a los tejidos normales de una persona, este proceso es lo que se denomina carcinogénesis (2).

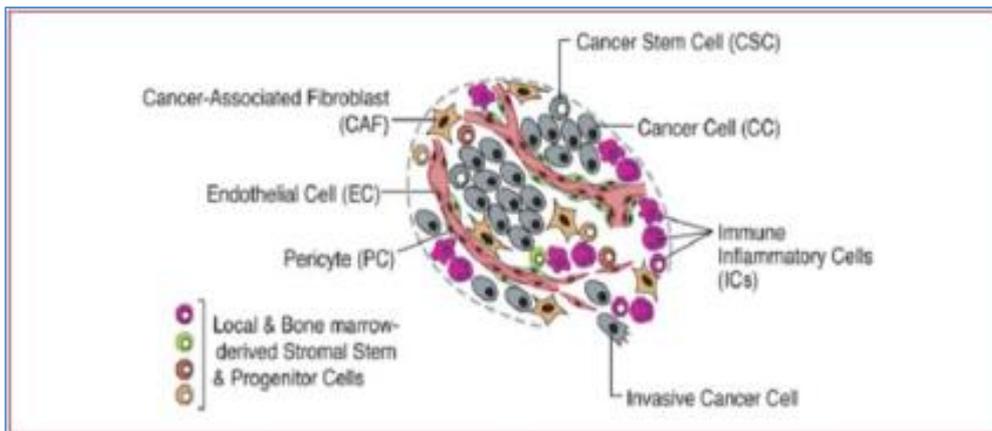
## 1.2 COMPONENTES DEL TUMOR

La complejidad de los tumores es equivalente a la de los tejidos sanos. Los tumores sólidos, por ejemplo, son estructuras complejas que no están formados por un único tipo de célula neoplásica, sino que son agrupaciones muy heterogéneas formadas por muy diversas estirpes celulares (figura 1).

Por un lado se encuentran el conjunto de células neoplásicas, donde coexisten diferentes regiones delimitadas por la vascularización, inflamación e invasividad del tumor, así como por los distintos grados de diferenciación celular.

Por otro lado esta el microambiente tumoral, las células malignas están rodeadas de diferentes tipos de poblaciones celulares, incluyendo células no cancerosas (fibroblastos, células endoteliales, células infiltrantes del sistema inmunológico), factores secretados solubles (factores de crecimiento, proteasas) y material sólido, el estroma (3). Las condiciones dentro de este microambiente, como son la hipoxia, pH bajo y niveles bajos de glucosa, favorecen la capacidad de mutar de las células cancerosas dando lugar a esta composición altamente variable.

Existe una señalización heterotípica recíproca entre las células neoplásicas y las células que forman el estroma de soporte tumoral. Esta red de interacciones entre ambos componentes es notablemente compleja y la gran mayoría de las moléculas que intervienen no se han identificado aún, pero se sabe que gracias a estas conexiones las células sufren una progresión histopatológica, transformándose gradualmente en tejidos malignos de alto grado.



**Figura 1.** Componentes de un tumor. Imagen obtenida de (4).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

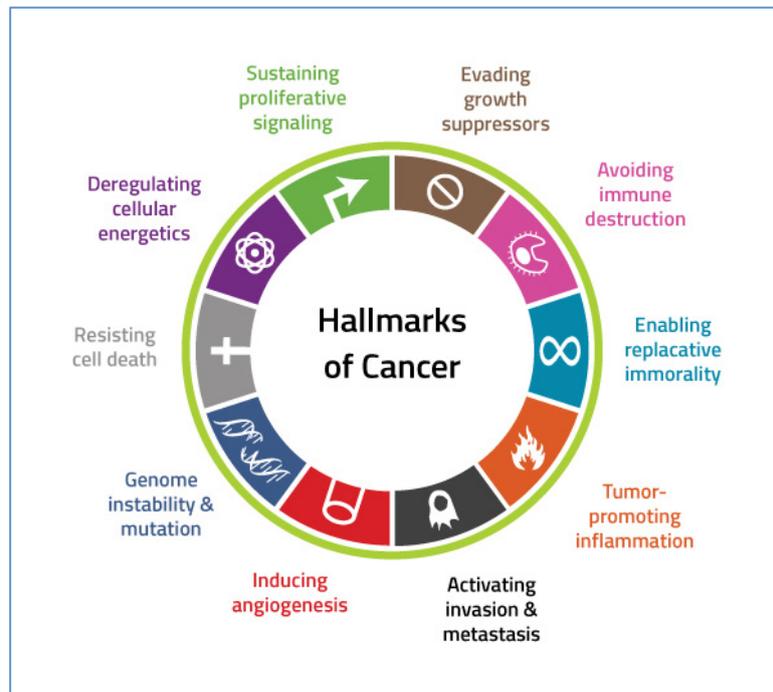
Durante la evolución de las células normales hacia este estado neoplásico, van adquiriendo una serie de capacidades características de la biología del cáncer (figura 2), que consisten en (5):

1. Mantenimiento de las señales de proliferación celular. Las células normales mantienen un cuidadoso control de las señales promotoras de su crecimiento, es decir, de las moléculas que inducen la entrada al ciclo de crecimiento celular y a la división, logrando así un gran equilibrio y el mantenimiento de la estructura normal de los tejidos. En cambio las células cancerosas consiguen desregular todos estos procesos, logrando una proliferación crónica mediante una activación constitutiva las señales de proliferación.
2. Evasión de los mecanismos supresores del crecimiento celular. A parte del mantenimiento positivo de las señales estimuladoras del crecimiento, son capaces de inhibir los mecanismos de retroalimentación negativa que en condiciones normales atenúan estas señales. Dos de los supresores tumorales prototípicos que deciden si una célula debe entrar o no en el ciclo de crecimiento y división son las proteínas del RB y el TP53, ambos inhibidos por las células neoplásicas, así como la evasión del mecanismo de inhibición por contacto que también actúa en las células normales.
3. Resistencia a los mecanismos de muerte celular. Una de las barreras naturales frente al desarrollo tumoral son los mecanismos de muerte celular. Cuando los “sensores de anormalidad” que tenemos en nuestro organismos detectan daños en el ADN de las células, señalización insuficiente de los factores de

supervivencia o una hiperactivación de las rutas de proliferación celular, liberan moléculas pro-apoptóticas que se encargan de destruir a las células que originan el daño. En las células neoplásicas este mecanismo está inhibido mediante la señalización excesiva de inhibidores de la apoptosis como pueden ser moléculas de la familia Bcl-2.

4. Inmortalidad replicativa. En condiciones normales las células no neoplásicas soportan un número limitado de ciclos de crecimiento y división celular, este número depende de la longitud de los telómeros, los cuales se encargan de proteger los extremos de los cromosomas. A medida que las células se dividen estos telómeros se van acortando perdiendo la capacidad de proteger los extremos del ADN hasta llegar un momento que son incapaces y se induce la senescencia o la muerte celular programada. Las células neoplásicas evitan este problema mediante el aumento de actividad de las ADN-polimerasas, moléculas especializadas en añadir y alargar los telómeros.
5. Angiogénesis. Los tumores, al igual que los tejidos sanos, para mantener su alto grado de crecimiento requieren de nutrientes y oxígeno así como evacuar los desechos metabólicos que generan. Para poder sustentar estas necesidades estimulan los procesos de neovascularización de manera continua, como es la estimulación del factor de crecimiento endotelial y la inhibición de inhibidores endógenos como son la angiotensina o la endostatina.
6. Invasión y metástasis de tejidos sanos a distancia. Otra de las grandes características definitorias del cáncer es su capacidad para migrar e invadir tejidos sanos a distancia, ello lo logra mediante la reducción de expresión de moléculas como la E-cadherina, molécula clave en la adhesión celular, el aumento de otras como la N-cadherina, clave en la migración celular, y la secreción aumentada de enzimas que degradan la matriz.
7. Reprogramación del metabolismo energético recular. Como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades neoplásicas se caracterizan por una proliferación descontrolada, para que esta situación se mantenga requieren de una alta tasa de energía que consiguen mediante glucólisis aeróbica. Reprograman el metabolismo de la glucosa para que en vez de glicólisis y, aún en presencia de oxígeno, la glucosa se degrade por glucólisis. A pesar de que consiguen menos ATPs por esta vía, solventan el problema con un aumento de la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1).
8. Evasión del sistema inmune. Nuestro sistema inmune tiene la capacidad de reconocer a las células tumorales e impedir su crecimiento y expansión

mediante una constantemente vigilancia en todo el organismo, aunque no siempre lo hace de manera eficiente. Muchos tumores disponen de diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune que origina una respuesta de tipo tolerogénica o permisiva con respecto al tumor, como la edición inmune o la presentación defectuosa de los antígenos.



**Figura 2.** Características de la biología del cáncer. Imagen obtenida de (5).

Cada tumor tiene un predominio de una o varias de estas características, la adquisición de ellas se produce progresivamente a lo largo de la tumorigénesis debido a la gran inestabilidad del genoma y la alta tasa de mutaciones que tienen estas células.

Cuando se produce el acortamiento de los telómeros aumenta mucho la mutabilidad del genoma, en condiciones normales estas células se destruirían, pero, como ya se mencionó anteriormente, al actuar de manera retardada la ADN-telomerasa y suprimir los sistemas de vigilancia, logran sobrevivir y evitar la apoptosis, manteniendo así las mutaciones adquiridas. Estos genotipos mutantes les confieren una posición ventajosa frente a las demás células.

Otra de las características de activación es la inflamación promovida por el tumor, que favorece el suministro de moléculas al microambiente tumoral, como son los factores de crecimiento, supervivencia y proangiogénicos entre otros.

Conociendo las capacidades biológicas que definen a las células tumorales seremos capaces de actuar con más precisión sobre los mecanismos que favorecen su crecimiento y evolución y combatir así las enfermedades neoplásicas.

## 2. OBJETIVOS

---

- Conocer las diferencias entre las terapias citotóxicas y las terapias dirigidas en el ámbito de la oncología y sus aportaciones a la terapéutica actual.
- Profundizar en las nuevas dianas de las terapias dirigidas, mecanismos de acción, indicaciones y efectos adversos.
- Esbozar nuevas perspectivas de futuro en el campo de las terapias dirigidas.

## 3. ENFOQUE TERAPÉUTICO

---

### 3.1 TERAPIAS CITOTÓXICAS VERSUS TERAPIAS DIRIGIDAS

Hace algunos años, las terapias empleadas en el tratamiento del cáncer se basaban en los fármacos citotóxicos y quimioterapias. Hoy en día, los estudios se centran en los fármacos con nuevas dianas, las terapias dirigidas, para complementar la acción de estas terapias convencionales y conseguir un control superior de la enfermedad.

Pero, ¿son mejores estas terapias dirigidas que la quimioterapia convencional? (6):

Su tamaño y estructura representa una de las diferencias más reseñables de ambas terapias. Por un lado, las moléculas de las terapias dirigidas son de elevado peso molecular y se obtienen a partir de organismos vivos, por lo que su síntesis conlleva un mayor número de controles y rigurosidad para evitar una gran heterogeneidad en el producto resultante. Mientras que los fármacos citotóxicos son moléculas de bajo peso sintetizadas a partir de productos químicos, lo que condiciona pocos pasos críticos durante su producción.

Otro aspecto en el que difieren ambas terapias es en el mecanismo de acción. Mientras que la quimioterapia actúa frente a dianas exclusivamente del ciclo celular e induce apoptosis originando una respuesta más contundente, las terapias dirigidas actúan frente a dianas mucho más concretas y específicas, sin inducir la muerte de la célula.

En cuanto a la cuantificación de esa respuesta, en caso de la quimioterapia, valoramos los criterios de citoreducción del tumor, mientras que las nuevas moléculas no siempre reducen el tamaño del tumor, sino que en algunos casos lo incrementan siendo una buena señal en algunas de estas terapias. Esto nos obliga a utilizar criterios de respuesta especiales.

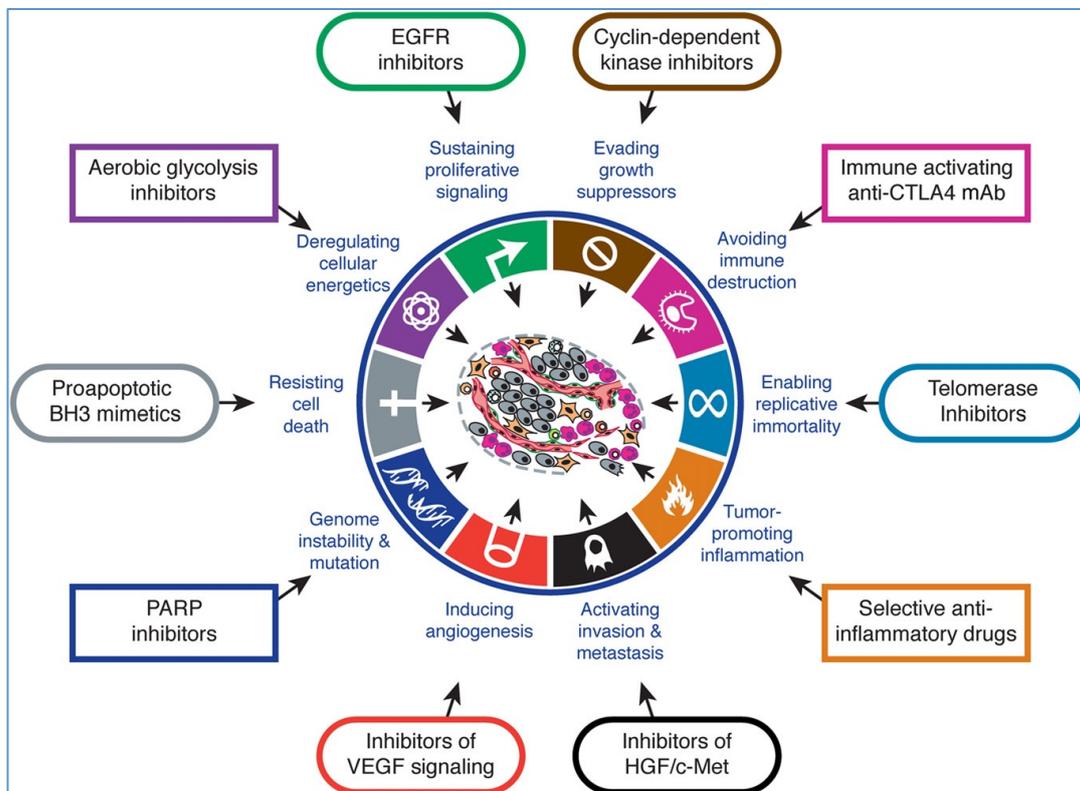
Con respecto a la toxicidad, es cierto que las terapias dirigidas inducen menos efectos secundarios, aunque algunos de los que producen no sabemos como tratarlos debido a el poco tiempo que llevan en el mercado.

En definitiva, aunque estas nuevas terapias presenten ciertas ventajas frente a las convencionales, no es positiva una comparación directa ya que depende de la situación en que se quiera emplear cada una de ellas.

En relación a las terapias dirigidas; la comprensión de las características de las células malignas, antes mencionadas, así como el mayor conocimiento del microambiente tumoral ha ayudado a desarrollar nuevas dianas farmacológicas y tratamientos eficaces más específicos y menos tóxicos frente a las enfermedades neoplásicas. Actuando sobre uno de estos mecanismos biológicos tan importante en el crecimiento de los tumores, es de suponer que consigamos afectar a la progresión de la enfermedad.

El problema es que la inestabilidad genética de las células neoplásicas favorece la aparición de múltiples resistencias. Estas células tienen cierta capacidad de adaptación frente a la inhibición farmacológica de estos procesos, por un lado utilizan varias vías de señalización para conseguir el mismo fin, y por otro, una vez que conseguimos inhibir ese mecanismo diana de acción, pueden reducir su dependencia de él y especializarse en uno de los restantes. Esto hace que debamos utilizar una combinación de terapias dirigidas frente a dianas de distintos procesos.

En la figura mostrada a continuación (figura 3) se representa un esquema de las diversas características que adquieren las células durante el proceso de tumorigénesis, y algunos de los fármacos que se utilizan para inhibir esos mecanismos.

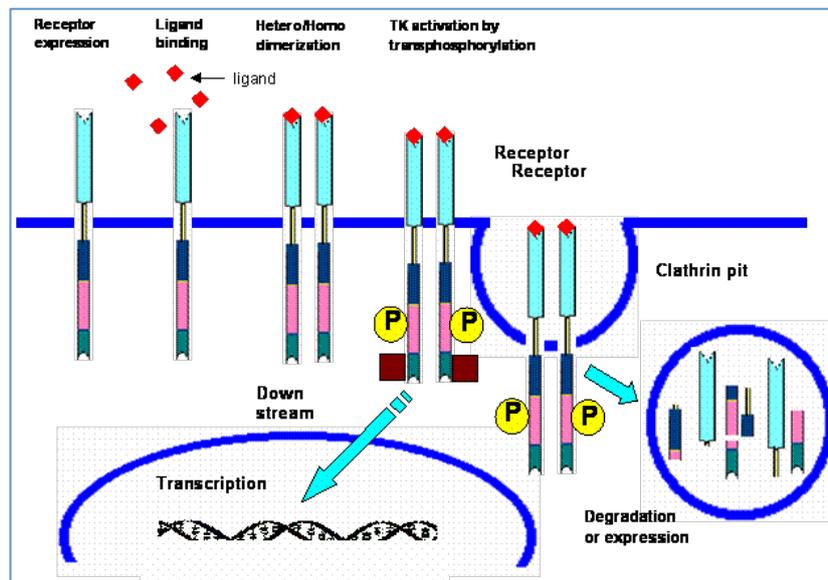


**Figura 3.** Dianas terapéuticas de la tumorigénesis. Imagen obtenida de (5).

Para comprender el funcionamiento de estos nuevos fármacos, debemos tener claros los acontecimientos que ocurren en el interior celular (figura 4).

La célula esta sujeta a estímulos (moléculas circulantes como citoquinas, hormonas, polipéptidos, etc...) que repercuten en su conducta, es lo que se conoce como ligandos, para que estos actúen es necesaria la presencia de receptores de membrana. La unión del ligando a su receptor correspondiente induce un cambio conformacional, que activa la fracción intracelular del receptor con acción tirosin kinasa.

La transformación de la señal externa (ligando) en un mensaje intracelular activa diferentes cascadas de señalización, secuencias de proteínas intracelulares que actuarán tanto a nivel del citoplasma como del núcleo celular, cuya función es esencialmente activadora. Como respuesta, habrá un aumento de síntesis proteica condicionando un aumento de tamaño de la célula, su entrada en el ciclo celular, etc... No todas las señales inducen activación, otras actúan como freno.



**Figura 4.** Mecanismos y rutas de activación celular. Imagen obtenida de (7).

Las terapias dirigidas están basadas en el empleo de fármacos o moléculas diseñadas para frenar al ligando, inhibir el receptor o impedir la acción de alguna proteína activadora del ciclo celular.

Nuestra primera diana serán los receptores de membrana, ya que su activación es la responsable del inicio del resto del proceso. Para frenar su activación podemos actuar mediante:

- Anticuerpos que actúan contra el ligando o contra el dominio extracelular del receptor.

- Inhibidores, que actúan inhibiendo la acción de la tirosin kinasa (inhibidores TKI) localizado en el dominio intracelular de los receptores.

Pero, no debemos olvidar que las terapias dirigidas también tienen como objetivo el estroma. Las dianas de estos fármacos actúan frente al microambiente tumoral, centrándose principalmente en el hueso y en los vasos sanguíneos. El objetivo de esta terapia antiestroma es potenciar la acción de los medicamentos tradicionales, buscar una sinergia con la quimioterapia y evitar la aparición de resistencias, para aumentar la duración del efecto del fármaco.

Su principal objetivo es cronificar la enfermedad, prolongar el tiempo libre de progresión, abolir las recaídas y aliviar síntomas, aportando calidad de vida siempre y cuando no se cause una excesiva toxicidad.

Para lograr este objetivo se pueden utilizar muchos fármacos y de muy diversa naturaleza, pero en esta revisión se comentarán las características y mecanismos de acción concretamente de los anticuerpos monoclonales. (6).

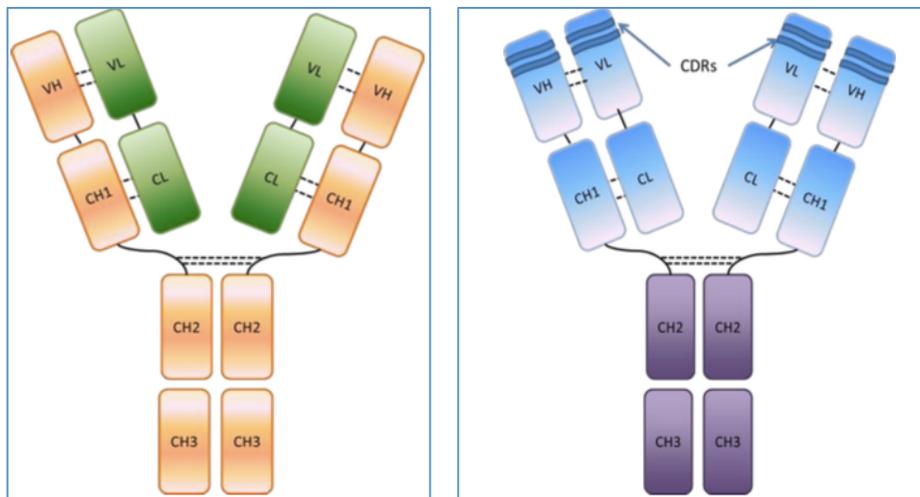
# 4. LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

## 4.1 GENERALIDADES

Los anticuerpos monoclonales se incluyen dentro de las terapias biológicas, las cuales han demostrado ser herramientas esenciales en el ámbito clínico, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de muy diversas enfermedades. Dentro de estas terapias se incluyen todo los medicamentos derivados de organismos vivos cuyo mecanismo de acción se basa en mediar reacciones inmunológicas específicas a través, en el caso de esta revisión, de anticuerpos.

Las características generales comunes de todos estos medicamentos biológicos son, un alto peso molecular, no metabolismo orgánico, actividad inmunológica inherente o escasa interacción con otros fármacos, entre otras (8). Pero, ¿qué son exactamente los anticuerpos monoclonales?.

Los anticuerpos monoclonales son glucoproteínas (también llamadas inmunoglobulinas) producidas por linfocitos B en respuesta a un estímulo antigénico, con la capacidad de reconocer y reaccionar únicamente frente a esa molécula específica que activó a la célula B (9).



**Figura 5.** Estructura de un anticuerpo. Figura de la izquierda: En naranja las cadenas pesadas y en verde las cadenas ligeras. Figura de la derecha: partes funcionales del anticuerpo. En azul se ha representado la región Fab y en morado la región Fc.

Existen cinco clases de anticuerpos con una estructura similar, formada por cuatro cadenas de aminoácidos, dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas mediante puentes disulfuro y representadas en forma de Y en la figura 5-izquierda. Son homogéneos en estructura y específicos en su acción.

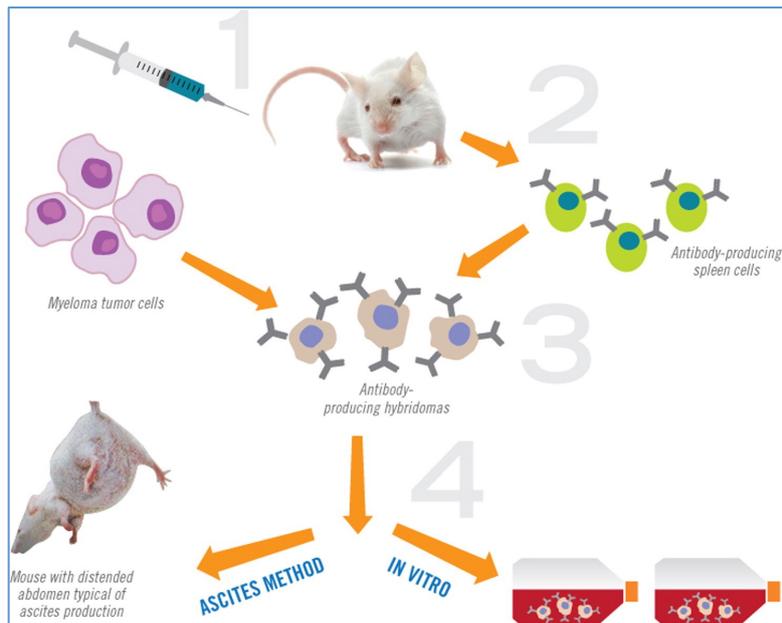
Las dos cadenas pesadas contienen la región constante (dominio Fc), idéntica en todos los tipos de inmunoglobulinas y responsable de la interacción con las células efectoras específicas. Por otro lado, las dos cadenas ligeras contienen las regiones variables (dominio Fab), responsables del reconocimiento y la unión al antígeno. Dentro de esta región está el epítipo, una secuencia concreta de aminoácidos que determina la especificidad del anticuerpo por un antígeno concreto, cada antígeno tiene varios epítipos diferentes (figura 5-derecha).

#### **4.1.1 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS**

Gracias a las técnicas de biología molecular e ingeniería genética y proteica se han encontrado técnicas como la hibridación, quimerización o humanización para la producción de grandes cantidades y así facilitar su uso. La producción de anticuerpos monoclonales fue establecida por Georges Köhler y César Milstein en 1975, mediante la fusión de dos células diferentes en distintos medios.

Por un lado se obtienen linfocitos B productores de anticuerpos procedentes de animales (ratones) previamente inmunizados con el antígeno que se quiere combatir y se hibridan con células tumorales de mieloma (linfocitos B cancerosos) que no producen inmunoglobulinas propias, pero que confieren la capacidad de división ilimitada. Esta fusión da lugar al hibridoma, célula inmortal con capacidad para producir de manera ilimitada anticuerpos monoclonales de interés, anticuerpos murinos. Posteriormente los hibridomas se amplían por el “método ascítico” (en el líquido peritoneal del animal) o “in vitro” (figura 6) (10) (11).

Con el tiempo se observó que los pacientes que recibían estos anticuerpos monoclonales de origen animal generaba intensas respuestas de hiperreactividad ante ellos, por lo que surgió la necesidad de utilizar otro tipo de anticuerpos que minimizaran esta respuesta inmune, los anticuerpos quiméricos. Estos anticuerpos combinan la región variable de las inmunoglobulinas de origen animal con una región constante humana, una vez recombinados se introducían en la célula del mieloma y seguían el mismo proceso antes descrito.



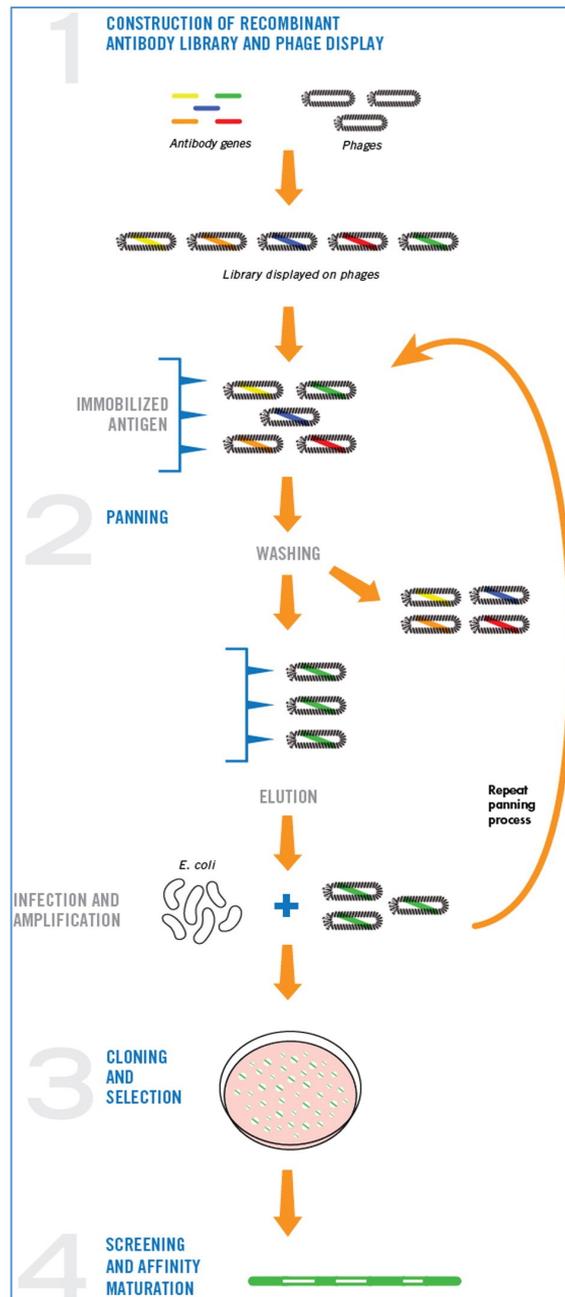
**Figura 6.** Los anticuerpos monoclonales han sido históricamente producido utilizando la ascitis o métodos "in vitro". Imagen obtenida de (10).

A pesar de no inducir respuestas reactivas tan importantes como los anticuerpos murinos, con el tiempo también acababan apareciendo anticuerpos anti-químicos, por esta razón en 1986 se incorporó la técnica de humanización de anticuerpos.

Esta técnica consiste en fusionar genes de anticuerpos con genes de proteínas de la superficie de un fago, haciendo que exprese los anticuerpos en su cubierta, posteriormente se seleccionan los anticuerpos mediante su unión al antígeno específico que queremos estudiar, se lavan el resto de complejos antígeno-anticuerpo inespecíficos o con baja afinidad y se amplían los clones seleccionados.

Los complejos seleccionados se introducen en una bacteria *E. coli* y se siembran en placas de agar donde se van seleccionando en base a su especificidad y desarrollando.

Aun así, sigue habiendo respuestas anti-anticuerpos humanizados, pero en un menor porcentaje que con los otros anticuerpos mencionados (figura 7) (10) (11).



**Figura 7.** Generación de anticuerpos recombinantes en fagos. Imagen obtenida de (10).

#### 4.1.2 NOMENCLATURA

La nomenclatura para denominar un anticuerpo monoclonal se divide en 4 partes, la primera es un prefijo variable elegido por el fabricante, la segunda nos indica la diana donde actúa el anticuerpo, la tercera parte el origen del compuesto y finalmente el tipo de anticuerpo que es, en la siguiente tabla se describe con mayor detalle (8).

1ª PARTE	2ª PARTE	3ª PARTE	4ª PARTE
NOMBRE	DIANA	ORIGEN	TIPO DE ANTICUERPO
Elegido por el fabricante	Tu: tumores Li: Sistema inmune Ba: Bacterias Ci: Cardiovascular Fu: Hongos Ki: Interleucinas Ne: Neuronas So: Huesos Vi: Virus	O: Ratón Xi: quimérico Zu: Humanizado U: Humano	Mab: monoclonal Pab: policlonal

**Tabla 1.** Nomenclatura de los anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo *Rituximab*, es un anticuerpo monoclonal (-mab), quimérico (-xi), que actúa frente a los tumores (-tu).

#### 4.1.3 APLICACIONES

Esta alta afinidad y especificidad que los define nos permite utilizarlo en muy diversos campos de la medicina, tanto en la investigación, como en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (enfermedades infecciosas, en alergología, induciendo inmunosupresión (enfermedades reumáticas, trasplantes..) e incluso en algunos trastornos cardiovasculares), pero una de sus principales áreas de acción, la que se va a comentar en esta revisión, es la oncología.

La administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado más de 20 anticuerpos monoclonales para su uso clínico en tumores malignos, y otros muchos se encuentran actualmente en distintas fases de ensayos clínicos (9).

Como ya sabemos, los anticuerpos actúan frente al ligando o al dominio extracelular del receptor, en distintas células. Podemos clasificarlos según sus respectivas dianas:

1. Anticuerpos que actúan directamente sobre las células tumorales.
2. Anticuerpos cuyo objetivo principal es el microambiente tumoral.
3. Anticuerpos que modifican el sistema inmune del huésped.

## 4.2 ANTICUERPOS FRENTE A CÉLULAS TUMORALES

### 4.2.1 DIANA: MODELO HER

Los anticuerpos monoclonales que actúan a nivel de las células tumorales, tienen como diana principal el factor de crecimiento epidérmico humano (HER: *Human epidermal growth factor receptor*), inhiben este receptor para evitar la activación constitutiva de las señales de proliferación.

El HER es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosin quinasa. Su estructura se divide en 3 dominios, uno extracelular donde se une el ligando, otro transmembrana y finalmente un dominio citoplasmático con la actividad tirosin quinasa que permite la transducción de señales.

En base al ligando que se une en el dominio extracelular, podemos encontrar 4 subtipos de receptor (12):

- HER1: Su ligando es el factor de crecimiento epidérmico, por lo que este receptor también es conocido por EGFR.
- HER2: No tiene ligando conocido.
- HER3 (no tiene actividad tirosin quinasa): Neuregulinas 1 y 2.
- HER4: Neuregulinas 3 y 4, Betacelulina, etc...

Una vez se une el ligando al receptor (a excepción de HER2), se produce la dimerización del receptor y se activa TK (salvo en HER3), desencadenándose señales de proliferación, supervivencia, etc.

La dimerización de los receptores puede ser homo (HER1 con HER1, HER2 con HER2, etc.) o heterodimerización (siendo las más potentes las que involucran a HER2).

En los momentos en que estos receptores no son necesarios para la célula, son endocitados mediante vesículas recubiertas de clatrina y, más adelante, serán degradados o volverán a expresarse en la membrana en función de las necesidades celulares.

La sobreactivación de estas vías de transducción se correlaciona con varios procesos malignos, tales como la progresión del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis, la angiogénesis o la capacidad de invasión tisular.

Los tumores con frecuencia expresan altos niveles de los receptores pertenecientes a esta familia. Además es frecuente la coexpresión aumentada de varios receptores homólogos (ej. HER1 + HER2).

En condiciones normales las células expresan entre 40.000-100.000 receptores de crecimiento epidérmico, pero en tumores como el de cabeza y cuello, pulmón, mama o colón, entre otros, hay concentraciones veinte veces mayores que en los tejidos no patológicos.

Esta sobreexpresión se relaciona con un comportamiento clínico más agresivo, un mayor índice de proliferación, mayor capacidad invasiva y por lo tanto un peor pronóstico.

SOBREEXPRESIÓN DE EGFR (HER1) EN TUMORES	
TUMOR	PORCENTAJE DE SOBREEXPRESIÓN
• Colon	• 25-77%
• Cabeza y cuello	• 80-100%
• Pancreático	• 30-50%
• Pulmón (no células pequeñas)	• 40-80%
• Mama	• 14-91%
• Renal	• 50-90%
• Ovario	• 35-70%
• Glioma	• 40-63%
• Vesícula	• 31-48%

**Tabla 2.** Expresión de los receptores EGFR en las células tumorales. Tabla obtenida de (13).

Para bloquear este sistema los anticuerpos monoclonales actúan frente al dominio extracelular, es una unión competitiva que impide la unión de los ligandos naturales impidiendo la dimerización y la posterior activación tirosin quinasa.

Dependiendo del receptor al que se unan nos encontraremos unos u otros anticuerpos. (14)

### **4.2.1.1 CETUXIMAB (15)**

#### ***¿Qué es?***

El Cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (IgG) producido por DNA recombinante.

Este agente antineoplásico fue autorizado para su comercialización en el ámbito hospitalario el 29 de junio de 2004 por la Agencia Europea del medicamento.

#### ***¿Cómo actúa?***

Es un anticuerpo monoclonal cuya diana específica son los receptores de EGFR (HER1). Se une a ellos con una afinidad 5-10 veces superior a los ligandos endógenos. Esta unión inhibe la función del receptor, inhibiendo la proliferación y apoptosis de las células tumorales, además favorece la internalización del receptor y atrae a las células inmunitarias del organismo hacia las células tumorales.

#### ***¿Indicación?***

Este fármaco tiene dos principales indicaciones, el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico y el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello.

En el primer caso actúa en aquellas células neoplásicas que expresen el EGFR con gen RAS nativo, y se administra:

- Como primera línea de tratamiento combinado con FOLFOX (Oxaliplatino)
- Combinado con quimioterapia (Irinotecan)
- Como monoterapia en pacientes en los que ha fracasado los tratamientos anteriores.

En los cánceres de cabeza y cuello se puede administrar en combinación con radioterapia en estadios localmente avanzados o junto con quimioterapia (platino) en estadios metastásicos o casos recurrentes.

#### ***¿Reacciones adversas?***

Los efectos secundarios más frecuentes relacionados con el Cetuximab son las reacciones cutáneas (presentes en más del 80% de los pacientes). Suelen manifestarse como erupciones acneiformes acompañadas de prurito o sequedad cutánea, pudiendo, aparecen generalmente durante las primeras semanas del tratamiento y se

resuelven tras la interrupción del mismo. En ocasiones pueden dar reacciones graves de necrosis cutánea (hasta en un 15%) y predisponer a sobreinfecciones por *S. aureus*, el síndrome de la piel escaldada por estafilococos o una fascitis necrotizante.

También se han observado diversas alteraciones electrolíticas. La hipomagnesemia la más frecuente de todas, aunque también puede ocasionar hipopotasemia (secundaria a la diarrea) o hipocalcemia (sobre todo en tratamientos combinados con Platino).

Otras reacciones adversas que también se han observado secundarias a la administración de este fármaco son las cefaleas, conjuntivitis, diarreas, náuseas y vómitos, aumento de las enzimas hepáticas y reacciones relacionadas con el lugar de perfusión (ej. mucositis) entre las más frecuentes.

Hay que tener cuidado con la interacción con otros fármacos ya que se ha observado un aumento de las reacciones adversas, por ejemplo trastornos hematológicos (neutropenias graves) cuando se administra combinado con platino, isquemias cardiacas cuando se junta con las fluoropirimidinas o diarreas graves en tratamientos concomitantes con XELOX.

#### **4.2.1.2 PANITUMUMAB (16)**

##### ***¿Qué es?***

El Panitumumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG2) producido por DNA recombinante.

Este fármaco se comenzó a comercializar el 3 de diciembre de 2007.

##### ***¿Cómo actúa?***

Es un anticuerpo monoclonal recombinante que se adhiere específicamente a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en la superficie celular. Al unirse a él inhibe la proliferación celular, induce la apoptosis de las células neoplásica y estimula el descenso de la producción de IL-8.

Al igual que el Cetuximab, este fármaco no ejerce su efecto en aquellas células que tengan el gen RAS mutado, ya que estas no dependen del EGFR para proliferar descontroladamente.

### ***¿Indicación?***

La principal indicación de este agente biológico es el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico con gen RAS no mutado.

Se puede utilizar tanto en monoterapia, como en combinación con tratamientos quimioterápicos:

- Combinado con quimioterapia tipo “FOLFOX” o “FOLFIRI”.
- De manera concomitante con quimioterapia “FOLFIRIR” cuando ha fracasado la primera línea de tratamiento con fluoropirimidinas.
- En monoterapia cuando han fracasado los tratamientos anteriores.

### ***¿Reacciones adversas?***

Las reacciones adversas que con más frecuencia se observan en los pacientes que se benefician del efecto de estos anticuerpos monoclonales son reacciones cutáneas, leves y moderadas en su mayoría. Con frecuencia son erupciones, dermatitis acneiformes, localizadas en cara, tórax superior y espalda, pudiendo extenderse a extremidades, si esto ocurre es muy común la inflamación de los lechos ungueales, paroniquias.

Otros efectos adversos comunes en estos pacientes son las alteraciones gastrointestinales (diarrea, náuseas y vómitos, estreñimiento o dolor abdominal) y trastornos generales como anorexia, fiebre, o fatiga.

Tras diversos estudios se han visto varias interacciones del panitumumab con otros fármacos. Es de destacar, debido a la importancia de sus efectos adversos, la interacción con Bevacizumab y quimioterapias que origina diarreas graves e incluso el aumento del número de muertes.

## **4.2.1.3 NECITUMUMAB (17)**

### ***¿Qué es?***

El Nectinumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG1) producido por células murinas mediante DNA recombinante. Este anticuerpo ha sido autorizado para su comercialización el 15 de febrero del 2016.

### ***¿Cómo actúa?***

El Necitumumab tiene una gran afinidad y una alta especificidad por el EGFR (HER1), se une a él y bloquea la progresión incontrolada de las células neoplásicas. Además, estudios in vitro, han demostrado que induce la internalización de estos receptores y su degradación.

### ***¿Indicación?***

La indicación terapéutica de este agente biológico es el cáncer de pulmón no microcítico escamoso, tanto localmente avanzado como en estadios neoplásicos, siempre que presente los receptores del factor de crecimiento epidérmico en su superficie.

Se usa como primera línea de esta enfermedad neoplásica, pero nunca en monoterapia, sino combinado con quimioterapia (Gemcitabina y cisplatino).

### ***¿Reacciones adversas?***

Las principales reacciones adversas que presentan los pacientes secundarias al uso de este medicamento, al igual que todos los inhibidores de EGFR, son las reacciones cutáneas y, en menor medida, las gastrointestinales.

Efectos adversos más específicos de este anticuerpo son las enfermedades tromboembólicas venosas, principalmente la embolia pulmonar y la trombosis venosa profunda.

Otras reacciones que se han visto son alteraciones a nivel analítico (hipomagnesemia e hipocalcemia) e incluso tricomegalia de pestañas.

Se desconoce la interacción del Necitumumab con otros fármacos por falta de estudios.

## **4.2.1.4 TRASTUZUMAB (18)**

### ***¿Qué es?***

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1) producido por células de ovario de hámster.

Su comercialización fue autorizada el 28 de agosto del año 2000.

### ***¿Cómo actúa?***

Este anticuerpo monoclonal está diseñado para unirse con gran afinidad y especificidad al dominio extracelular (subdominio IV) de HER2, el cual está sobreexpresado en un gran porcentaje de células tumorales. Al unirse a esta estructura específica inhibe la vía de señalización de este receptor inhibiendo la proliferación de las células neoplásicas.

### ***¿Indicación?***

Las principales indicaciones que tiene este agente biológico son dos, el cáncer de mama y el cáncer gástrico metastásico.

En ambos casos, para que pueda utilizarse este fármaco, es preciso que los tumores sobreexpresen el receptor HER2 en su membrana. Esto ocurre en  $\frac{1}{4}$  de los tumores de mama y en  $\frac{1}{5}$  de los tumores gástricos.

Como terapia en el cáncer de mama se utiliza en:

- Cáncer de mama precoz: Como monoterapia tras la cirugía, quimioterapia y radioterapia, en combinación con quimioterapias adyuvantes y en cánceres localmente avanzados como tratamiento combinado con quimioterapia antes y después de la cirugía.
- Cáncer de mama metastásico: Se usa como monoterapia cuando han fracasado tratamientos anteriores (quimioterapia y tratamiento hormonal) o en combinación con otras quimioterapias como tratamiento de primera línea o inhibidores de la aromatasa en aquellas pacientes postmenopausicas.

La segunda indicación es el cáncer gástrico metastásico, en esta situación se utiliza siempre en combinación con otras quimioterapias como tratamiento de primera línea.

### ***¿Reacciones adversas?***

Las reacciones adversas características secundarias a la administración de este fármaco son la cardiotoxicidad y los problemas pulmonares adversos.

Debido a estos efectos secundarios está contraindicado la administración de este antineoplásico en personas con dificultades respiratorias graves en reposo que precisen oxigenoterapia. En personas con problemas cardíacos o hipertensos hay que aumentar la vigilancia estrecha durante todo el tratamiento y controlar su función cardíaca regularmente.

Otros efectos secundarios que pueden presentar estos pacientes son las infecciones, la hematotoxicidad (sobre todo neutropenia), o reacciones secundarias al modo de perfusión (mayor número de efectos secundarios cuando se administra de manera subcutánea).

#### **4.2.1.5 PERTUZUMAB (19)**

##### ***¿Qué es?***

El Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, tipo IgG1, obtenido a partir de células de ovario de hámster por tecnología de DNA recombinante.

Fue autorizado para su comercialización el 4 de marzo de 2013.

##### ***¿Cómo actúa?***

Este agente biológico reconoce los receptores HER2 sobreexpresados en las células tumorales, se une a su dominio extracelular (subdomino II) y bloquea la heterodimerización de este receptor inhibiendo así el crecimiento descontrolado de las células neoplásicas.

##### ***¿Indicación?***

La indicación terapéutica del pertuzumab es el cáncer de mama con receptores HER2 positivos:

- En caso de cáncer de mama metastásico o localmente avanzado recidivante se usa en combinación con quimioterapia (docetaxel) y trastuzumab como tratamiento de primera y segunda línea respectivamente.
- En cánceres de mama en estadios temprano pero con un alto riesgo de recidivar, se usa en combinación con quimioterapia y trastuzumab como tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía.

##### ***¿Reacciones adversas?***

Este fármaco al no utilizarse nunca como monoterapia, presenta efectos secundarios propios del trastuzumab y de la quimioterapia. Los efectos adversos más frecuentes son la alopecia, náuseas y diarrea y la neutropenia, pudiendo esta última dar una neutropenia febril y ocasionar la muerte.

## 4.3 ANTICUERPOS ANTI-ESTROMA

El objetivo de este grupo de anticuerpos monoclonales es potenciar la acción de los medicamentos tradicionales, buscar una sinergia con la quimioterapia y evitar la formación de resistencias, para aumentar la duración del efecto del fármaco.

Para conseguir esos propósitos esta terapia, en vez de atacar a las células tumorales, ataca el estroma, utilizando como diana principal los huesos y los vasos sanguíneos.

### 4.3.1 DIANA ÓSEA (20) (21)

En el hueso sano adulto se encuentra RANK, un receptor al que se une una RANKL. Este ligando se encarga de mantener el equilibrio entre la formación y la resorción ósea.

Sin embargo, cuando hay células tumorales en el organismo, tienden a anidar en el hueso y estimular los osteoblastos que aumentan la expresión de RANKL fisiológica. Este ligando actúa a nivel de los osteoclastos activando con ello la destrucción de los huesos. Secundario a esta destrucción ósea, se produce una mayor liberación de factores de crecimiento a la matriz ósea que favorece el crecimiento tumoral (figura 8.)

En resumen, el estroma está sano y las funciones llevadas a cabo son totalmente fisiológicas, sin embargo la célula tumoral las sobreestimula en su propio beneficio desencadenando un círculo vicioso de destrucción ósea y actividad tumoral difícil de parar.

#### 4.3.1.1 DENOSUMAB (22)

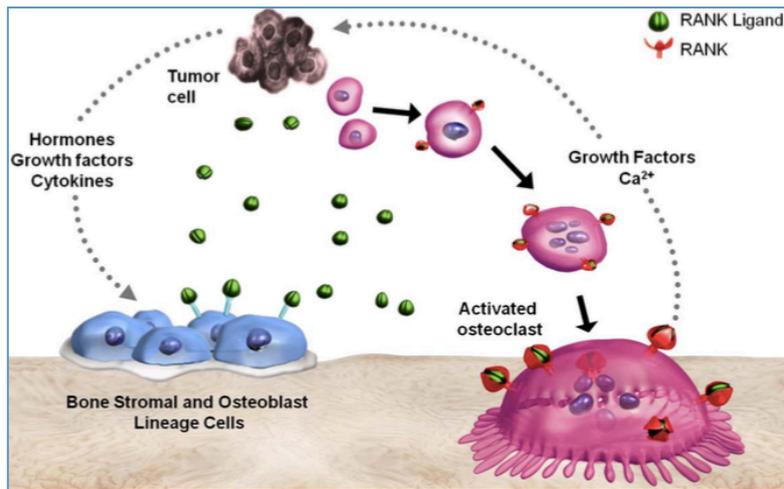
##### *¿Qué es?*

El Denosumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG2) producido por tecnología DNA recombinante.

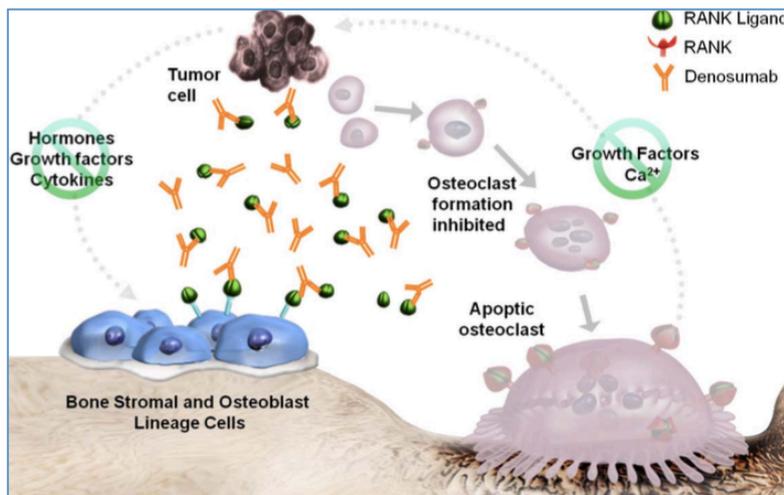
Se autorizó para su comercialización el 13 de julio del 2011.

##### *¿Cómo actúa?*

Este anticuerpo monoclonal se une al antígeno RANKL. Al unirse a este ligando impide que se una a su receptor RANK, produciendo una disminución en el número y la funcionalidad de los osteoclastos, disminuyendo con ello la resorción y la pérdida ósea.



**Figura 8.** Mecanismo fisiológico de la vía RANK. Imagen obtenida de (23).



**Figura 9.** Mecanismo de acción de Denosumab. Imagen obtenida de (23).

### ***¿Indicación?***

Este fármaco tiene dos indicaciones principales:

- Tratamiento de las complicaciones óseas secundarias a estadios tumorales localmente avanzados o metástasis, como pueden ser las fracturas óseas patológicas o compresiones de la médula espinal.
- Tratamiento en el tumor óseo de células gigantes en pacientes adolescentes y adultos con el esqueleto óseo maduro, en los cuales el tumor sea irresecable o la cirugía este contraindicada por morbilidades graves.

### ¿Reacciones adversas?

Las reacciones adversas que con mayor frecuencia se ven en estos pacientes son la disnea, la diarrea y los dolores musculoesqueléticos. Otros que también pueden aparecer, aunque en un menor porcentaje de pacientes son alteraciones metabólicas como la hipocalcemia (tetania, convulsiones o confusión) y la hipofosfatemia, sudoración excesiva, pérdidas dentales e incluso osteonecrosis mandibular.

### 4.3.2 DIANA VASCULAR (24) (25)

En este caso, en vez de actuar contra la destrucción del hueso lo que se busca inhibir es la angiogénesis tumoral, mediante la inhibición de los mediadores moleculares que estimulan la proliferación del endotelio (VEGF).

Es VEGF el factor de crecimiento del endotelio vascular, una proteína circulante en la sangre que es clave en la angiogénesis. Actúa a través de la unión a receptores de membrana (VEGFR), fundamentalmente del endotelio, estos receptores son moléculas con actividad tirosina quinasa que favorecen la formación de vasos nuevos para la nutrición y oxigenación del tumor.

Con los anticuerpos monoclonales podemos alterar esta función angiogénica de dos maneras distintas. Por un lado podemos alterar la función del receptor, mediante un anticuerpo que se fije a él e impida su unión con VEGF, o bien, podemos utilizar anticuerpos que actúen directamente sobre el ligando. Ambos casos van a ser muy efectivos en tumores que sean muy dependientes de la angiogénesis para su supervivencia.

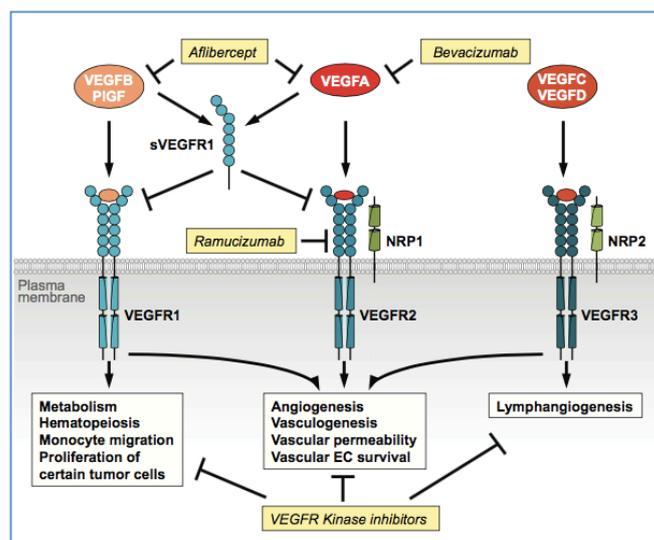


Figura 10. Mecanismo fisiológico de la angiogénesis. Imagen obtenida de (26).

### **4.3.2.1 BEVACIZUMAB (27)**

#### ***¿Qué es?***

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado producido a partir de células de ovario de hámster con tecnología de DNA recombinante.

Su comercialización fue autorizada el 12 de enero del 2005.

#### ***¿Cómo actúa?***

Este anticuerpo se une al factor de crecimiento endotelial vascular inhibiendo su actividad biológica, lo que produce una regresión en la vascularización de los tumores y la inhibición de neovascularización, impidiendo el crecimiento tumoral.

#### ***¿Indicación?***

El Bevacizumab es un fármaco con indicación en muchos tumores sólidos del organismo, pero nunca como monoterapia sino combinado con otros medicamentos:

- Cáncer de colon o recto metastásico en combinación con fluoropirimidina.
- Cáncer de mama metastásico como tratamiento de primera línea en combinación con Paclitaxel. En aquellos pacientes en los que este está contraindicado la quimioterapia con taxanos o antraciclinas puede combinarse con Capecitabina.
- Cáncer de pulmón no microcítico en estadios avanzados, metastásico o recidivantes como tratamiento de primera línea combinado con quimioterapias basadas en platino.
- Cáncer de riñón avanzado o metastásico en combinación con interferón alfa-2<sup>a</sup> como primer tratamiento.
- En tratamientos de cánceres ginecológicos como el epitelial de ovario, el cáncer de las trompas de Falopio o cáncer de cérvix, en estadios avanzados o recurrentes.

### ***¿Reacciones adversas?***

Las reacciones adversas más frecuentemente observadas durante el tratamiento con este anticuerpo son la hipertensión, la fatiga o astenia, la diarrea y el dolor abdominal.

Sin embargo, no todos los efectos secundarios que puede producir no son graves, también se han notificado casos de perforación gastrointestinal, hemorragia (típica la hemoptisis en aquellos pacientes en tratamiento por cáncer de pulmón no microcítico) y tromboembolismo arterial.

### **4.3.2.2 RAMUCIRUMAB (28)**

#### ***¿Qué es?***

El Ramucirumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humano (EgG1) obtenido a través de tecnología de DNA recombinante de células murinas.

Fue autorizado para su comercialización y uso hospitalario el 19 de diciembre del 2014.

#### ***¿Cómo actúa?***

Como anticuerpo monoclonal antiangiogénico tiene un mecanismo de acción similar al descrito anteriormente en el Bevacizumab, sin embargo el Ramucirumab, en vez de unirse al ligando se une al receptor del VEGF (receptor tipo 2), consiguiendo así la reducción del aporte sanguíneo al tumor y con ello impidiendo su crecimiento.

#### ***¿Indicación?***

Este agente biológico tiene numerosas indicaciones terapéuticas, pero nunca esta indicado como tratamiento de primera línea, sino cuando la enfermedad ha progresado a pesar del tratamiento con otras terapias. Se suele dar en combinación con diferentes agentes quimioterápicos.

- Cáncer gástrico avanzado y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica en combinación con paclitaxel.
- Cáncer colorrectal metastásico combinado con quimioterapia tipo FOLFIRI.
- Cáncer de pulmón no microcítico escamoso avanzado en tratamiento combinado con docetaxel.

### ***¿Reacciones adversas?***

Los efectos adversos más frecuentemente observados en los pacientes que siguen tratamientos con Ramucirumab son fatiga o debilidad, leucopenia, neutropenia, diarrea, epíxtasis y estomatitis.

Mientras que los efectos más graves comunicados son la perforación gastrointestinal, la hemorragia gastrointestinal grave y el tromboembolismo arterial.

## **4.4 ANTICUERPOS QUE MODIFICAN EL SISTEMA INMUNE DEL HUÉSPED**

El sistema inmune tiene la capacidad de reconocer a las células tumorales e impedir su crecimiento y expansión mediante una constantemente vigilancia en todo el organismo para detectar precozmente su aparición. Para comprender mejor la detección de estas células tumorales es necesario comprender las características que permiten al sistema inmune reconocer las células extrañas de los tumores.

En condiciones normales las células propias de cada persona presentan unas proteínas de superficie, los antígenos, que son reconocidas por el sistema inmune como propias, evitando así que estas células sean atacadas y eliminadas, es lo que se conoce como tolerancia inmune. Los antígenos asociados al tumor no son reconocidos como propios ya que cuando las células normales se convierten en cancerígenas estos antígenos mutan haciéndose extraños y reconocibles para nuestro sistema inmune, activándolo y eliminando todos los agentes que tengan antígenos extraños.

En la respuesta inmune antitumoral efectiva, las células presentadoras de antígenos, ubicadas por todo el organismo (células dendríticas y macrófagos) son capaces de detectar y capturar a las células tumorales. En ese momento, las células presentadoras expresan fragmentos de los antígenos y se los presentan a los linfocitos T. Para que estos se activen requieren además señales co-estimuladoras (ej. B7-CD28) y secreción de citoquinas que promuevan la respuesta inmune antitumoral (ej. IL-12), una vez activados adquieren la capacidad de reconocer todo lo que tenga el antígeno presentado (29). Este proceso conlleva múltiples interacciones entre diversos receptores y ligandos que serán dianas tanto para el cáncer, como para la terapia inmunológica.

Esta vigilancia inmunológica ocurre constantemente en nuestro organismo, aunque no siempre de manera eficiente. La supresión en cualquier punto de este proceso puede

dar como resultado tolerancia inmune a las células cancerosas. Factores tanto tumorales como del propio organismo pueden alterar este mecanismo favoreciendo el desarrollo del tumor y su progresión descontrolada, limitando la respuesta inmune eficaz a pesar de tener un sistema inmune normal. Algunos tumores expresan muy bajas cantidades de antígenos propios, lo que dificulta su reconocimiento como extraño y dan lugar a una escasa respuesta inmune, además su gran capacidad de crecimiento puede sobrepasar la capacidad del SI para erradicar estas células tumorales (30).

Muchos tumores disponen de diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune que origina una respuesta de tipo tolerogénica o permisiva con respecto al tumor. Esta evasión inmune del cáncer es un importante obstáculo, por lo que es una importante diana en los tratamientos inmunoterápicos. Los mecanismos que resultan en la evasión del tumor del ataque inmune son muy diversos (31).

- a) La edición inmune. Los tumores evaden la vigilancia inmunológica debido a que se encuentran en un estado de senectud en el que pueden estar latentes durante años y después reemerger.
- b) La presentación defectuosa de los antígenos. Debido a una alteración del complejo de histocompatibilidad (MHC I) el linfocito T es incapaz de reconocerlo.
- c) La supresión inmune en el microambiente tumoral mediada por las células T reguladoras. Tienen una mayor actividad supresora que las de origen natural, además hay mayor cantidad en el microambiente por un aumento del factor de crecimiento TGF- $\beta$ , que transforma los linfocitos T CD4 en linfocitos T reguladores/supresores in situ. Las células T específicas del tumor presentan un aumento de receptores inhibidores, como son los linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4) que evitan la sinapsis inmunológica entre los linfocitos T y las células dendríticas, las proteínas de muerte programada (PD1) o el gen de activación de linfocitos LAG3, que inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T. Otras moléculas inhibidoras adicionales son la TIM3, CD200, TIGIT o el factor atenuador de linfocitos B y T (BTLA) entre otros, todas ellas posibles objetivos en la inmunoterapia (32).

Además, los tumores pueden presentar otros elementos inmunosupresores que favorezcan su progresión, como la producción de citoquinas inmunosupresoras por parte de los linfocitos T citotóxicos, el TGF-B, IL-1 o IL-6 (33).

También factores como el VEGF contribuyen a la evasión inmune mediante la inhibición de la diferenciación de las células dendríticas, la presencia del receptor RCAS1 o la secreción de enzimas inmunosupresoras como IDO, arginasa o IKK.

Otros mediadores de la actividad tumoral como son las células supresoras derivadas mieloides (MDSCs), células dendríticas moduladas (DCs) o macrófagos M2 favorecen un microambiente inflamatorio y colaboran con un aumento de la supresión inmune. Las MDSCs a medida que aumentan los mediadores inflamatorios se hacen resistentes a la apoptosis mediada con las células T de nuestro organismo. Los macrófagos M2 producen altos niveles de TGF- $\beta$ , IL-10 y VEGF que promueven el crecimiento del tumor. Y finalmente las DCs presentan bajos niveles de CD80 y CD86 lo que contribuye a la supresión de la inmunidad de las células T.

El objetivo de la inmunoterapia en las enfermedades neoplásicas es aumentar la capacidad del sistema inmune de detectar las células aberrantes mediante la supresión de los mecanismos tumorales de evasión inmune (34) (35) (36).

El enfoque principal de estas terapias era la mayor activación de células T específicas del tumor y otras células efectoras inmune. Debido a que los tumores han desarrollado la capacidad de usar otros mecanismos reguladores para suprimir esta respuesta antitumoral, se han buscados otros mecanismos para mantener la respuesta inmune actualidad. Estos nuevos fármacos son los inhibidores de los puntos de control, los cuales juegan un papel clave en la inmunoterapia (37).

#### **4.4.1 ANTI-CD20 (38)**

Los anticuerpos monoclonales pertenecientes a este grupo están diseñados para unirse al antígeno CD20, proteína que se encuentra en la superficie de todas las células B, tanto células normales como tumorales (ej. esta presente en el 95% de todos los linfomas no-Hodgkin).

Por un lado el dominio variable del anticuerpo se une a CD20 y por el otro, la fracción constante activa una respuesta de aproximación por la que recluta a los efectores de la respuesta inmune para inducir la destrucción del linfocito. Inducen la lisis tumoral por citotoxicidad mediada por el complemento, por macrófagos o células natural killer e incluso, induciendo la apoptosis de la propia célula B.

#### **4.4.1.1 RITUXIMAB (39)**

##### ***¿Qué es?***

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano producido a partir de ingeniería genética. La región constante es de una inmunoglobulina IgG1 humana y la fracción variable procede de células murinas.

Fue autorizado para su comercialización por la Comisión Europea el 2 de junio de 1998.

##### ***¿Indicación?***

En el campo de la oncología, este anticuerpo tiene dos indicaciones principales:

- Linfomas no-Hodgkin (linfoma folicular y linfoma difuso de células B grandes): En estas enfermedades puede utilizarse tanto en monoterapia como combinado con quimioterapia.
- Leucemia linfática crónica: En este caso se utiliza combinado con quimioterápicos.

##### ***¿Reacciones adversas?***

Las reacciones adversas que con mayor frecuencia aparecen en estos pacientes son las reacciones relacionadas con la perfusión, siendo las más frecuentes la fiebre, los escalofríos, las náuseas, o las erupciones y urticaria entre otros. Otros efectos secundarios al uso de este fármaco son las infecciones (tanto bacterianas como víricas) y las alteraciones hematológicas (neutropenia, leucopenia o trombocitopenia).

Las reacciones más graves que pueden dar, menos frecuentes que las anteriores, son las alteraciones cardiovasculares (angina, FA, IAM o insuficiencia cardíaca) y reacciones a la perfusión mayores como el síndrome de liberación de citoquinas o el de lisis tumoral.

#### **4.2.1.2 OFATUMUMAB (40) (41)**

##### ***¿Qué es?***

El Ofatumumab es un anticuerpo monoclonal humano (IgG1), producido a partir de células recombinantes murinas.

Se autorizó su comercialización el 19 de abril de 2010.

### ***¿Indicación?***

La indicación terapéutica de este agente biológico es el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica, se utiliza combinado con diferentes quimioterapias en aquellos pacientes refractarios al tratamiento habitual con fludarabina.

### ***¿Reacciones adversas?***

Los principales efectos adversos al uso de este fármaco son las infecciones respiratorias, tanto de vías alta (resfriados), como de vías bajas (neumonía), alteraciones hematológicas (neutropenia o anemia) y reacciones secundarias a la perfusión como náuseas, fiebre o erupción cutánea.

## **4.2.1.3 OBINUTUZUMAB (42)**

### ***¿Qué es?***

El Obitunuzumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 humanizado a partir de un anticuerpo murino por tecnología DNA recombinante.

Se comenzó a comercializar el 23 de julio del 2014.

### ***¿Indicación?***

Al igual que el Ofatumumab, la indicación terapéutica de este agente biológico es la leucemia linfocítica crónica. Es un tratamiento de primera línea, combinado con clorambucilo en pacientes que no puedan ser tratados con fludarabina.

### ***¿Reacciones adversas?***

Los efectos más frecuentes son los secundarios a las reacciones de perfusión y las alteraciones hematológicas, al igual que ocurría con los otros anti-CD20 ya comentados.

Sin embargo entre las reacciones menos frecuentes pero más graves que pueden ocasionar estos fármacos destaca, además del síndrome de lisis tumoral y las alteraciones cardíacas, la leucoencefalopatía multifocal progresiva.

#### **4.4.2 ANTI-CTLA 4 (43)**

CTLA-4 es una proteína situada en la superficie de los linfocitos T que se encarga de inhibir su actividad.

Los anticuerpos pertenecientes a este grupo actúan sobre este punto de control, bloqueando esta proteína, produciendo así una mayor activación y expansión de los linfocitos T, es decir, aumenta la respuesta inmune frente a las células tumorales.

##### **4.4.2.1 IPILIMUMAB (44)**

###### ***¿Qué es?***

El Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal (IgG1κ) anti-CTLA-4 humano, producido a partir de células de hámster por tecnología de DNA recombinante.

Fue autorizada por la comisión europea su comercialización el 13 de julio del 2011.

###### ***¿Indicación?***

La indicación de esta agente biológico antineoplásico es el tratamiento del melanoma en estadios avanzados (irreseccable o metastásico).

###### ***¿Reacciones adversas?***

Las reacciones adversas secundarias al uso de este fármaco en el tratamiento del melanoma están muy relacionadas con un exceso de actividad del sistema inmune, sin embargo, suelen remitir al interrumpir la terapia.

Los efectos más frecuentes son diarrea, náuseas o vómitos, erupción cutánea y prurito, fiebre, disminución de apetito y dolor abdominal.

#### **4.4.3 ANTI-PD1 (45)**

El PD1 es un punto de control llamado “muerte celular programada”, es un regulador negativo de los linfocitos T. Los anticuerpos monoclonales pertenecientes a este grupo se unen a este receptor y lo bloquean, impidiendo la inactivación de estas células y potenciando la respuesta del sistema inmunitario frente a las células tumorales.

#### **4.4.3.1 NIVOLUMAB (46)**

##### ***¿Qué es?***

El Nivolumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG4) producido a partir de células de hámster por tecnología DNA recombinante.

Su comercialización fue autorizada el 19 de junio del 2015.

##### ***¿Indicación?***

Este anticuerpo tiene 3 indicaciones terapéuticas principales:

- Melanoma en estadios avanzados e irresecables en monoterapia.
- Cáncer de pulmón escamoso no microcítico diseminado, cuando han fallado los tratamientos previos con quimioterapia.
- Carcinoma de células renales como monoterapia en situaciones en las que han fallado los tratamientos anteriores con otro tipo de terapias antineoplásicas.

##### ***¿Reacciones adversas?***

Los efectos secundarios a la toma de esta medicación más frecuentes son la fatiga, náuseas y diarrea, erupciones cutáneas y prurito.

También está asociado a reacciones inmunitarias debido al aumento de actividad del sistema, sin embargo suelen ser leves y desaparecer cuando se interrumpe el tratamiento.

#### **4.4.3.2 PEMBROLIZUMAB (47)**

##### ***¿Qué es?***

El Pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG4), igual que el Nivolumab.

Se autorizó su uso hospitalario el 17 de julio del 2015.

##### ***¿Indicación?***

La indicación terapéutica de este anticuerpo es el tratamiento en monoterapia del melanoma metastásico e irresecable en adultos.

***¿Reacciones adversas?***

Los efectos adversos secundarios a la terapia son los mismos que se observan en los pacientes que toman Nivolumab (antes descritos).

## 5. CONCLUSIONES

---

### 5.1 ENFOQUES FUTUROS (48) (49) (50) (51) (52)

Actualmente la comprensión que se ha alcanzado con respecto a las características biológicas del cáncer y a los mecanismos de regulación de nuestro sistema inmune frente a su amenaza, nos ha proporcionado una base sólida para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas, como son los anticuerpos monoclonales.

Los avances en el campo de estos tratamientos han permitido mejorar la respuesta antitumoral mediante el bloqueo específico de diferentes vías utilizadas por los tumores para eludir la vigilancia inmune, crecer e invadir tejidos a distancia. Sin embargo, las células neoplásicas tienen una gran capacidad de adaptación frente a esta inhibición farmacológica, pueden reducir su dependencia funcional de una vía y especializarse en otra para seguir evolucionando.

Esta inestabilidad de la respuesta tumoral obliga a perfeccionar los tratamientos antitumorales y a continuar la investigación a múltiples niveles para mejorar los tratamientos actuales.

Actualmente hay muchos fármacos en diferentes fases de ensayos clínicos que aún no han salido al mercado como el Inotuzumab (anti-CD22), el Tremelimumab (Anti-CTLA4), Durvalumab (anti PD1-L1) o Pidilizumab (anti PD-1), todos actúan sobre dianas ya comentadas en esta revisión pero prometen mejorar la eficacia con unos efectos secundarios mínimos y complementar las terapias ya existentes aumentando el control sobre las enfermedades neoplásicas.

Otra de las estrategias investigadas para optimizar la respuesta del organismo frente a esta enfermedad son las combinaciones sinérgicas entre los grupos de fármacos ya conocidos. Para aumentar la respuesta antitumoral se ha visto que es clave el bloqueo de las vías tumorales de evasión inmunitaria, destacando el papel primordial de los inhibidores de los puntos de control inmune (CTLA4 y PD1, entre otros), por su mecanismo de acción y por la durabilidad de su respuesta. Sumando esta respuesta a la conseguida con otros monoclonales que actúan en otras dianas conseguimos atacar las neoplasias desde diferentes puntos para alcanzar una respuesta óptima.

Además de la combinación entre distintos fármacos biológicos está en investigación la combinación de estas inmunoterapias con los tratamientos citotóxicos tradicionales como son la quimioterapia o la radioterapia, con terapias dirigidas como los anticuerpos antiEGFR o antiHER2.

Aunque estas nuevas terapias no son todo ventajas, en su desarrollo se están encontrando obstáculos como la excesiva toxicidad resultante de la combinación de dos potentes agentes antitumorales, la necesidad de encontrar antígenos tumorales más específicos de cada tumor para no dañar células sanas del organismo o el requerimiento de biomarcadores que puedan predecir la respuesta previamente a establecer los tratamientos.

Un punto importante fuera del ámbito de la clínica médica es el precio realmente alto que tienen estos fármacos biológicos. Un punto de desarrollo en el futuro es el campo de los biosimilares, los “genéricos” de estos productos biológicos que permitirán una gran contención económica del sistema sanitario ofreciendo una eficacia y seguridad muy similar a los anticuerpos comentados en esta revisión.

La mejor comprensión de las dianas tumorales y los avances en las nuevas terapias antitumorales han abierto un camino muy prometedor para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas, sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer perfeccionando las estrategias e integrándolas finalmente en la práctica clínica habitual.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Seom.org. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? [Online].; 2016. Available from: <http://www.seom.org/en/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>.
2. Aecc.es. ¿Qué es el cáncer? [Online].; 2016. Available from: <https://www.aecc.es/SOBREELCANCER/ELCANCER/Paginas/¿Quéeselcáncer.aspx>.
3. Tumoral C|CDdM. CancerQuest | A Cancer Education Resource. [Online].; 2016. Available from: <http://www.cancerquest.org/es/conditions-tumor-microenvironment.html>.
4. UAM) MA(dBMDI. Uam.es. [Online].; 2016. Available from: [http://www.uam.es/ss/Satellite/es/1242652962055/1242665585088/articulo/articulo/Quien\\_a\\_buen\\_arbol\\_se\\_arrima\\_buena\\_sombra\\_le\\_cobija.htm](http://www.uam.es/ss/Satellite/es/1242652962055/1242665585088/articulo/articulo/Quien_a_buen_arbol_se_arrima_buena_sombra_le_cobija.htm) [Accessed 19 May 2016].
5. Hanahan DaWR. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011; 144(5): p. 646-674.
6. Institute NC. Terapias dirigidas contra el cáncer. [Online].; 2016. Available from: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas>.
7. Paul MK MAPMMA. Medsci.org. [Online].; 2004. Available from: <http://www.medsci.org/v01p0101.htm>.
8. Munar M,PJ,SJ,Va,BaaGL. Scielo. Revista med (online). [Online].; 2012. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-52562012000200009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-52562012000200009&script=sci_arttext).

9. Administration FUSFaD. Guidance for Industry: Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing.. [Online].; 2016. Available from: <http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/blood/ucm076753.htm>.
10. Groff K e. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. PubMed - NCBI. [online]. 2016.
11. Machado N,TGaCJ. Monoclonal antibodies: physical development and therapeutic perspectives. Infectio, [online]. 2006; 3(10): p. 189-197.
12. Mendelsohn JaBJ. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene. 2010; 19(56): p. 6550-6565.
13. Herbst RaSD. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors. Cancer. 2012; 94(5): p. 1593-1611.
14. Redman J,HE,ADaWL. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. Molecular Immunology. 2015; 67(2): p. 28-45.
15. Ficha Técnica Erbitux. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf).
16. Ficha técnica Vectibix. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000741/WC500047710.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf).
17. Ficha técnica Portrazza. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003886/WC500202694.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003886/WC500202694.pdf)

18. Ficha técnica Herceptin. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000278/WC500074922.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000278/WC500074922.pdf).
19. Ficha técnica Perjeta. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002547/WC500140980.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002547/WC500140980.pdf).
20. Cheng MaFL. Effects of RANKL-Targeted Therapy in Immunity and Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014 Enero; 3.
21. Narayanan P. Denosumab: A comprehensive review.. *South Asian Journal of Cancer*. 2013; 2(4): p. 272.
22. Ficha técnica Xgeva. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002173/WC500110381.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002173/WC500110381.pdf).
23. D. R. AMGEN. [Online].; 2012. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/OncologicDrugsAdvisoryCommittee/UCM290403.pdf>.
24. Zhao. Y AA. Targeting Angiogenesis in Cancer Therapy: Moving Beyond Vascular Endothelial Growth Factor. *The Oncologist*. 2015 May 22;(14).
25. Gacche. R MR. Angiogenic factors as potential drug target: Efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014.
26. Ye. W. The Complexity of Translating Anti-angiogenesis Therapy from Basic Science to the Clinic. *Cell*. 2016 Apr 18;(37): p. 114 - 125.
27. Ficha técnica Avastin. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000582/WC500029271.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000582/WC500029271.pdf).

28. Ficha técnica Cyramza. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002829/WC500180724.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002829/WC500180724.pdf).
29. Workenhe ST,VML,&MKL. The role of oncolytic virus immunotherapies to subvert cancer immune evasion. *Future Oncology*. 2015; 11(4): p. 675-689.
30. Canceronline.cl. Sistema Inmune y Cáncer. [Online].; 2016. Available from: [http://www.canceronline.cl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=51&Itemid=56](http://www.canceronline.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=51&Itemid=56).
31. Vinay DS,REP,PG,TWH,SJ,EE.&SE. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. In *Seminars in cancer biology*. 2015 Diciembre; 35: p. S185-S198.
32. Turnis ME A. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. *European journal of immunology*. 2015; 45 (7): p. 1892-1905.
33. Chow MT &. Chemokines in cancer. *Cancer immunology research*. 2014; 2 (12): p. 1125-1131.
34. Weber JSI. Current perspectives on immunotherapy. *Seminars in oncology*. 2014 Octubre; 41: p. 14-29.
35. Karlitepe A,OO,&ACB. New approaches for cancer immunotherapy. *Tumor Biology*. 2015; 36(&): p. 4075-4078.
36. Disis ML. Mechanism of action of immunotherapy. *Seminars in oncology*. 2014 Octubre; 41: p. 3-13.
37. Ito A,KS,TK,&KS. Clinical development of immune checkpoint inhibitors. *BioMed research international*. 2015; 2015.

38. Bachireddy P,BUE,RM,&WCJ. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. Nature Reviews Cancer. 2015; 15(4): p. 201-215.
39. Ficha técnica Mabthera. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000165/WC500025821.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf).
40. Frustaci AM,TA,PP,CR,&MM. Clinical utility and patient considerations in the use of ofatumumab in chronic lymphocytic leukemia. Biologics: targets & therapy. 2015; 9(75).
41. Ficha técnica Arzerra. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001131/WC500093091.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001131/WC500093091.pdf).
42. Ficha técnica Gazyvaro. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002799/WC500171594.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002799/WC500171594.pdf).
43. Turnis ME,ALP,&VDA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy. European journal of immunology,. 2015; 45(7): p. 1892-1905.
44. Ficha técnica Yervoy. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002213/WC500109299.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002213/WC500109299.pdf).
45. Zheng P,&ZZ. Human Cancer Immunotherapy with PD-1/PD-L1 Blockade. Biomarkers in cancer. 2015; 7(Suppl 2): p. 15.
46. Ficha técnica Opdivo. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003985/WC500189765.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003985/WC500189765.pdf).

47. Ficha técnica Keytruda. [Online]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/003820/WC500190990.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/003820/WC500190990.pdf).
48. Henricks LM,SJH,HAD,&BJH. The use of combinations of monoclonal antibodies in clinical oncology. Cancer treatment reviews. 2015; 41(10): p. 859-867.
49. Rini B. Future approaches in immunotherapy. In Seminars in oncology. 2014 Octubre; 41: p. S30-S40.
50. Research AAFc. First Immunotherapy Combo Approved for Cancer. Cancer Discovery. 2015 Octubre.
51. Garnett-Benson C,HJW,&GSR. Combination regimens of radiation therapy and therapeutic cancer vaccines: mechanisms and opportunities.. In Seminars in radiation oncology. 2015; 25(1): p. 46-53.
52. Yilmaz M,RS,&JE. The clinical potential of inotuzumab ozogamicin in relapsed and refractory acute lymphocytic leukemia. Therapeutic advances in hematology. 2015; 6(5): p. 253-259.