



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Determinación de PD-L1 exosomal en pacientes con neoplasias avanzadas

Jorge Eduardo Duque Arbeláez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Medellín, Colombia
2023

DETERMINACION DE PD-L1 EXOSOMAL EN PACIENTES CON NEOPLASIAS AVANZADAS

Jorge Eduardo Duque Arbeláez.

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Biotecnología

Director:

Neil Aldrin Vásquez Araque
Biólogo, Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, Doctor en Biotecnología

Línea de Investigación:
Biotecnología en Salud

Grupo de Investigación:
Biotecnología Animal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Medellín Colombia
2024

Agradecimientos

Al profesor Neil Vásquez de la Universidad Nacional de Colombia, por su acompañamiento en este proceso de formación.

Al grupo de Biotecnología Animal, particularmente a Laura, Diego y Karent, quienes se han apasionado en este campo de la Biotecnología en Salud, con su altruismo para el desarrollo de estrategias que impacten la Sociedad.

A la empresa Exosomas, que ha permitido el Desarrollo de ideas innovadoras en el Sistema de salud para humanos.

Al Centro Oncológico de Antioquia, además de facilitar el material biológico para el Desarrollo de ese trabajo, su apoyo ético y reuniones académicas con pares académicos con el fin de enriquecer este trabajo de investigación

Al Área Curricular Biotecnología y su personal administrativo. A la Universidad Nacional de Colombia.

A mi Familia en el Eje Cafetero, a mi esposa Beatriz y mis amados hijos Carito y Daniel Emilio.

Resumen

El campo de los biomarcadores en cáncer constituye una extensa área de investigación aún en fase de exploración. Muchas de las complicaciones asociadas con el cáncer derivan de la carencia de un diagnóstico expedito y las limitaciones para monitorear la enfermedad una vez iniciada la terapia. Las técnicas actualmente empleadas suelen requerir intervenciones invasivas o el uso de costosos equipos de imagenología, inaccesibles para gran parte de la población. Los biomarcadores presentes en biopsias líquidas, como la sangre u orina, poseen el potencial de proporcionar información sobre el estado tumoral. En este contexto, los exosomas generados por los tumores y presentes en los biofluidos ofrecen la posibilidad de medir marcadores de su membrana, garantizando un diagnóstico preciso. El presente estudio establece parámetros definidos para la recolección, procesamiento y análisis de muestras sanguíneas de pacientes con neoplasias avanzadas que expresan el marcador PD-L1 exosomal. Los exosomas obtenidos de la línea celular A549 de cáncer de Pulmón y de pacientes se purificaron a partir de columna de afinidad y ultrafiltración, posteriormente se caracterizaron mediante diferentes técnicas como proteína total con Bradford; NTA, DLS, Acetilcolinesterasa, microscopia electrónica y se evaluó su capacidad de inmunomodulación, finalmente se cuantificó la proteína PD-L1 exosomal con técnica de ELISA, como resultado se obtuvo una cuantificación de PD-L1 exosomal en líneas celulares A549 con una media de 189 ng/mg de proteína vs 22,5 ng/mg de proteína en células mesenquimales y en los 4 pacientes evaluados una media de 38,8 ng/mg de proteína vs 0,1 ng/mg de proteína en individuo sano, encontrando una diferencia significativa en los valores tanto en cultivo celular A549 como en niveles séricos de pacientes con neoplasias avanzadas.

La medición de PD-L1 exosomal emerge como una herramienta prometedora para futuros análisis en poblaciones más extensas de pacientes con neoplasias que expresan este marcador mediante inmunohistoquímica. Esta técnica podría facilitar un seguimiento más preciso, auxiliando al oncólogo en la toma de decisiones clínicas.

Palabras clave: Exosomas, PD-L1, PD1, ELISA, Biopsia líquida, Cultivo *in vitro*

DETERMINATION OF EXOSOMAL PD-L1 IN PATIENTS WITH ADVANCED NEOPLASMS

Abstract

The field of biomarkers in cancer is a vast area of research that is still being explored. Many of the complications associated with cancer stem from the lack of an expeditious diagnosis and the limitations of monitoring the disease once therapy has been initiated. The techniques currently employed often require invasive interventions or the use of expensive imaging equipment, inaccessible to a large part of the population. Biomarkers present in liquid biopsies, such as blood or urine, have the potential to provide information on tumor status. In this context, exosomes generated by tumors and present in biofluids offer the possibility to measure markers of their membrane, guaranteeing an accurate diagnosis. The present study establishes defined parameters for the collection, processing and analysis of blood samples from patients with advanced neoplasms expressing the exosomal PD-L1 marker. Exosomes derived from the A549 lung cancer tumor line and from patients are separated and purified by affinity columns and/or ultrafiltration. Subsequently, they are characterized by techniques such as total protein quantification with Bradford, NTA, DLS, TEM and evaluation of their immunomodulation capacity. Finally, PD-L1 protein is quantified by ELISA assays. As a result, a quantification of exosomal PD-L1 was obtained in A549 cell lines with an average of 189 ng/mg of protein vs 22.5 ng/mg of protein in mesenchymal cells and in the 4 patients evaluated, an average of 38.8 ng/mg of protein vs 0.1 ng/mg of protein in a healthy individual, finding a significant difference in the values both in cell culture A549 and in serum levels of patients with advanced neoplasias. Furthermore, the amount of PD-L1 protein is significantly higher in exosome samples than in the soluble fraction of blood or urine. Measurement of exosomal PD-L1 emerges as a promising tool for future analyses in larger populations of patients with malignancies expressing this marker by immunohistochemistry. This technique could facilitate more accurate follow-up, assisting the oncologist in clinical decision making.

Keywords: Exosomes, ELISA, PD-L1, PD1, liquid biopsy, *in vitro* culture

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Planteamiento del problema | 13 |
| 3. Justificación..... | 15 |
| 4. Marco teórico..... | 17 |
| 5. Hipótesis y Objetivos | 25 |
| 5.1. Hipótesis..... | 25 |
| 5.2. Objetivos..... | 25 |
| 5.2.1. Objetivo General | 25 |
| 5.2.2. Objetivos Específicos | 25 |
| 6. Metodología..... | 26 |
| 6.1. Diseño experimental | 26 |
| 6.2. Consideraciones éticas..... | 27 |
| 6.3. Cultivo celular y aislamiento de exosomas..... | 28 |
| 6.4. Purificación y caracterización de exosomas..... | 29 |
| 6.5. Biopsias tumorales y líquidas..... | 31 |
| 6.6. Efecto de la inmunomodulación de los exosomas..... | 32 |
| 6.7. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble | 33 |
| 6.8. Análisis estadístico | 34 |
| 7. Resultados y Discusión..... | 35 |
| 7.1. Caracterización de exosomas provenientes de líneas celulares de cáncer de pulmón..... | 35 |
| 7.2. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble en muestras derivadas de cultivo celular de A549..... | 40 |
| 7.3. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble en muestras derivadas de pacientes con Cáncer | 44 |
| 8. Conclusiones | 52 |
| 9. Recomendaciones | 53 |
| Bibliografía..... | 54 |

Lista de figuras

| | | |
|---------------------|---|----|
| Figura 1-1: | Expresión de PD-L1 en diferentes tipos de cáncer | 11 |
| Figura 1-2: | Expresión de PD-L1 en diferentes tipos de cáncer | 12 |
| Figura 4-1: | Eje PD-1/PD-L1..... | 19 |
| Figura 4-2: | Identificación de PD-1 / PD-L1..... | 20 |
| Figura 4-3: | Vías involucradas en la comunicación célula a célula por exosomas..... | 21 |
| Figura 4-4: | Modulación de la respuesta inmune por exosomas..... | 21 |
| Figura 6-1: | Cultivo de células de cáncer de pulmón A547..... | 29 |
| Figura 6-2: | Metodología de recolección de exosomas derivados de líneas celulares. | 29 |
| Figura 6-3: | Metodología del ensayo del efecto inmunomodulador | 33 |
| Figura 6-4: | Metodología de ELISA para la cuantificación de PD-L1..... | 34 |
| Figura 7-3: | Caracterización por NTA de exosomas purificados por ultrafiltración | 36 |
| Figura 7-2: | Caracterización por NTA de exosomas purificados por columna | 36 |
| Figura 7-3: | Cuantificación de proteína exosomal | 37 |
| Figura 7-4: | Cuantificación de la actividad enzimática Acetilcolinesterasa | 38 |
| Figura 7-5: | Caracterización de exosomas tumorales por TEM | 39 |
| Figura 7-6: | Caracterización de exosomas tumorales de cáncer por DLS..... | 39 |
| Figura 7-7: | Niveles de PD-L1 exosomal y soluble..... | 43 |
| Figura 7-8: | Efecto inmunomodulador de los exosomas..... | 44 |
| Figura 7-9: | PD-L1 exosomal en biopsias líquidas por método de purificación | 46 |
| Figura 7-10: | Niveles de PD-L1 exosomal en biopsias líquidas..... | 49 |

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 7-1: Resultados de aislamiento y cuantificación de exosomas ... | 38 |
| Tabla 7-2: Parámetros estadísticos..... | 40 |
| Tabla 7-3: Prueba de homogeneidad de varianzas..... | 41 |
| Tabla 7-4: Análisis de Varianza... .. | 41 |
| Tabla 7-5: Comparación de medias de PD-L1 en células | 42 |
| Tabla 7-6: Efecto inmunomodulador de los exosomas | 44 |
| Tabla 7-7: Niveles de PD-L1 - Métodos de purificación | 45 |
| Tabla 7-8: Comparación de medias de PD-L1 en biopsias líquidas | 45 |
| Tabla 7-9: Paciente 1..... | 47 |
| Tabla 7-10: Paciente 2... .. | 47 |
| Tabla 7-11: Paciente 3....., | 48 |
| Tabla 7-12: Paciente 4.....,, | 48 |

1. Introducción

Según datos del Globocan, Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2020, ocasionó 19.292.789 casos nuevos y 9.958.133 defunciones. Cerca del 70% de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos, siendo el cáncer de Pulmón para el 2020 el causante de 1.796.144 decesos (18%) ocupando el primer lugar en mortalidad, seguido por cáncer de colon con 953.173 decesos (9.4%) (The Global Cancer Observatory, 2020).

En Colombia, los Departamentos con mayor número de casos por 100.000 habitantes en Colombia son: Antioquia, Cesar, Risaralda, Quindío, Valle y Caldas (Sispro, 2020). En cuanto a la mortalidad, en el año 2020 aproximadamente 15 de cada 100 fallecimientos se atribuyeron al cáncer, generando indicadores de 47,710 personas fallecidas por esta enfermedad, con una tasa cruda de mortalidad del 94.7 por cada 100 mil habitantes, por tipo de cáncer la tasa de mortalidad se registró así: Tumores de órganos digestivos 15.2%, Próstata 13.7%, Mama en mujer 13,7% (Sispro, 2020).

Como ejemplo, la mayoría de los pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón debutan en estadios avanzados, después de realizar un diagnóstico apropiado e instaurada una terapia específica, los parámetros de evaluación definidos por guías internacionales (NCCN Guidelines Version 1.2023) son el chequeo clínico y de imágenes (radiografías, gammagrafías, Pet CT) siendo en ocasiones poco específicos, implican también altos costos, exposición a radiación y medios de contraste, pudiendo no siempre evaluar la actividad tumoral, (Chatterjee & Zetter 2005), el seguimiento ideal debe complementarse con análisis de biopsias líquidas con biomarcadores tumorales, los cuales aún no se han establecido en la práctica clínica rutinaria, por varias razones entre otras al poco acceso debido a precios elevados de la prueba, un ejemplo es la Carga tumoral mutacional (*TMB tumor mutational burden*). Sólo en ciertos subtipos tumorales quienes expresan mutación en factor de crecimiento epidérmico (EGFR) podría realizarse biopsia líquida y como aproximación diagnóstica molecular y no para seguimiento, por lo anterior existe la limitante en el seguimiento con biomarcadores solo por dar un ejemplo en una patología tan frecuente como el cancer de Pulmon.

Los biomarcadores tumorales es un término usado para describir muchos marcadores biológicos de neoplasias malignas en el diagnóstico, seguimiento y progresión, pueden ser proteínas, ctDNA, células tumorales circulantes, etc. Idealmente debería ser específico a un tipo particular de tumor, no deben estar presentes en tejidos normales ni en individuos sanos y deben reflejar actividad biológica tumoral. En la práctica clínica Oncológica solo ciertos Biomarcadores séricos tumorales son útiles para el seguimiento, ejemplo Antígeno prostático específico (PSA) en el seguimiento a pacientes con cáncer de Próstata, CA 125 en cáncer de Ovario, CA 19.9 en cáncer de Páncreas, Antígeno Carcinoembrionario en cáncer de colon, Gonadotropina coriónica y alfafetoproteína en Cáncer de testículo; La mayoría de los tumores sólidos restantes carecen de Biomarcadores de seguimiento. (Chatterjee SK.,2005).

En este escenario un potencial marcador es la proteína PD-L1 (Ligando-1 de muerte programada). La PD-L1 interactúa con otra proteína llamada PD-1 (Proteína 1 de muerte celular programada), que está presente en la superficie de los linfocitos T. Cuando PD-L1 se une a PD-1, actúa como un punto de control, suprimiendo la actividad de los linfocitos T. Esta interacción es parte de un mecanismo natural que ayuda a evitar que el sistema inmunológico ataque las células normales del cuerpo y provoque enfermedades autoinmunes. Sin embargo, muchas células tumorales aprovechan este mecanismo de interacción entre el ligando y la proteína PD-L1/PD-1 para evadir el ataque del sistema inmune, al expresar PD-L1 en su superficie, las células tumorales pueden inhibir los linfocitos T que, de otro modo, tienen la función de detectar atacar y eliminar estas células extrañas. Este mecanismo de evasión inmunitaria permite que las células tumorales proliferen y se diseminen sin que el sistema inmune las pueda eliminar (Sharpe, 2018).

La evaluación de la expresión de PD-L1 en gran parte de los tumores sólidos es esencial para determinar si un paciente podría beneficiarse del tratamiento con inhibidores del punto de control inmune (Figura 1-1).

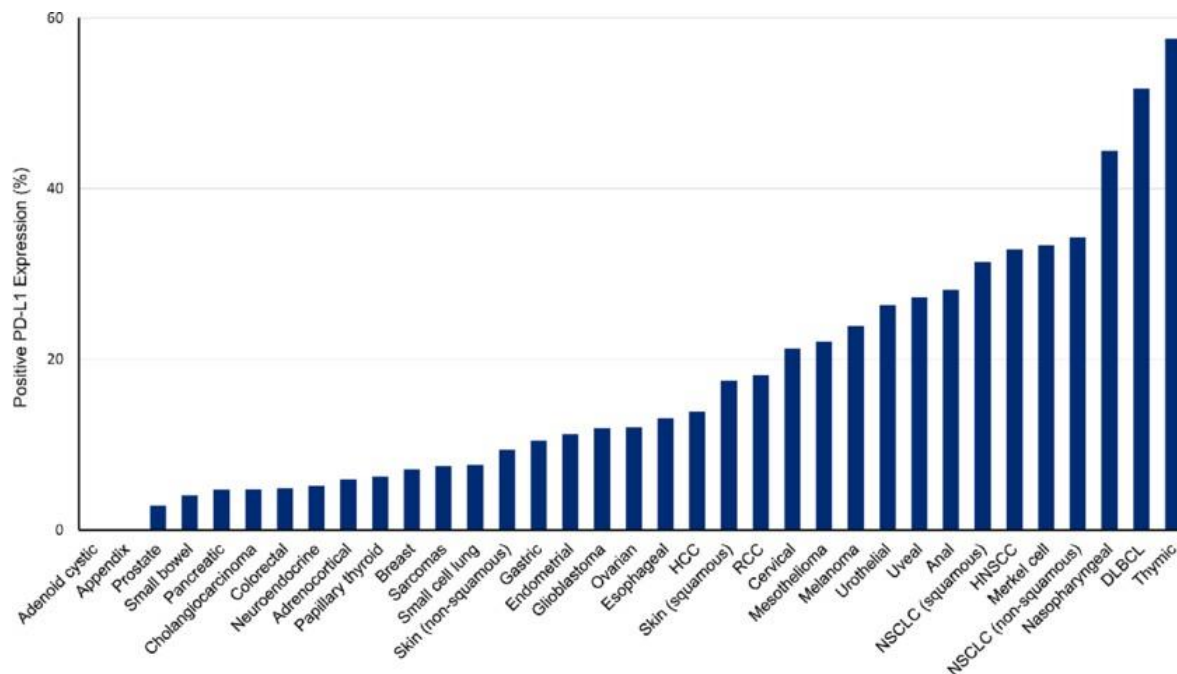


Figura 1-1. Expresión de PD-L1 en diferentes tipos de cáncer, determinado por inmunohistoquímica. (Yarchoan et al., 2019).

La inmunohistoquímica (IHC) se usa comúnmente para detectar y evaluar la expresión de PD-L1 en muestras de patología tumoral. Según el nivel de expresión de PD-L1, se puede decidir si es probable que un paciente sea tributario a dicha terapia con inhibidores de puntos de control de PD-L1/PD-1 (Tan, S., Zhang, CH. & Gao, (2016).

En la marcación de Inmunohistoquímica en tejido tumoral se utiliza la puntuación positiva combinada (CPS) que evalúa la expresión de PD-L1 en células tumorales y en células del sistema inmune del microambiente tumoral (linfocitos y macrófagos) en relación a todas las células viables x 100, dando un porcentaje, siendo la mayoría de las indicaciones de tratamiento susceptibles de manejo por encima del 1%, siendo la primera aprobación por FDA bajo esta recomendación en Octubre de 2015 para pacientes con cáncer de Pulmón de células no pequeñas metastásico con Inmunohistoquímica CPS mayor del 1%, y en 2017 para pacientes con presencia de inestabilidad microsatelital (Michael M et al., 2018).

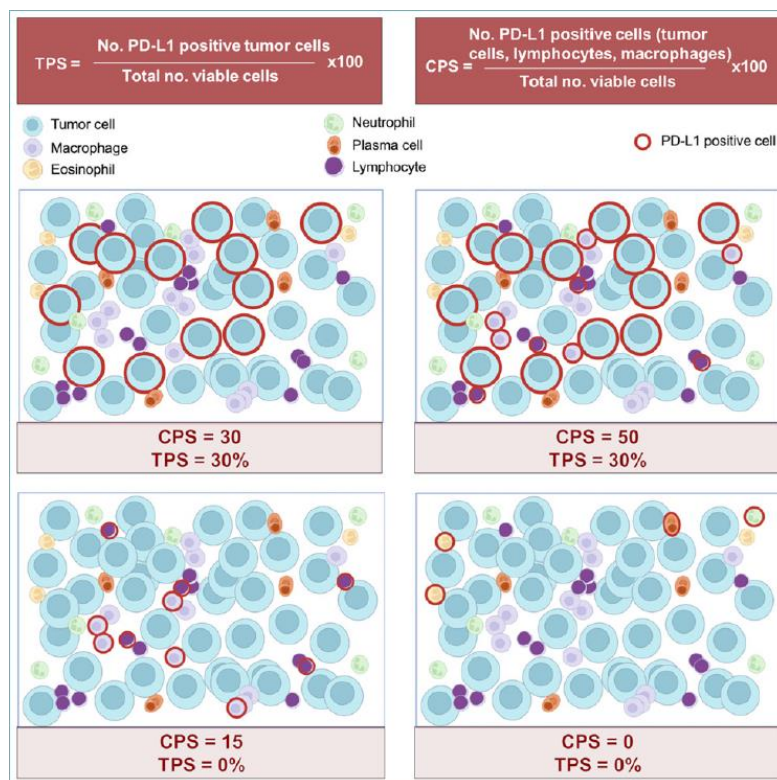


Figura 1-2. Puntuación TPS y CPS en inmunohistoquímica.

Muchos tumores sólidos pueden expresar PD-L1 en su superficie, lo que los convierte en blancos potenciales para las terapias con inhibidores de puntos de control de PD-L1/PD-1 (Herbst R.S.2014). El descubrimiento de la vía PD-L1/PD-1 condujo al desarrollo de una clase de fármacos de inmunoterapia contra el cáncer conocidos como inhibidores de puntos de control inmune. Dichos anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ligando Anti PD-L1 (Atezolizumab, Durvalumab, Avelumab) o contra el Receptor Anti PD1 (Pembrolizumab, Nivolumab). Estos medicamentos funcionan bloqueando la interacción entre PD-L1 y PD-1, liberando así los frenos del sistema inmune y permitiéndole desarrollar una respuesta más fuerte contra las células tumorales. Son de amplio uso en el armamentario terapéutico Oncológico actual, con clara evidencia de Beneficio clínico aumentando la expectativa de vida de muchos pacientes con cáncer, (Wu, 2022) dando paso al término inmunoterapia como el pilar fundamental del manejo del cáncer en la actualidad, desafortunadamente los costos de estos medicamentos son elevados y en ocasiones no se obtiene la respuesta clínica deseada a pesar de haber presentado un marcador por inmunohistoquímica inicial positivo para PD L1 (Szu-Chun, 2023) debido a mecanismos de evasión inmune.

2. Planteamiento del problema

Según datos en el marco del aseguramiento en Colombia, al 31 de diciembre de 2022, se informaron a las cuentas de Alto costo del Ministerio de salud de Colombia en total 491.048 personas estaban diagnosticadas con algún tipo de cáncer. Según la información preliminar, entre el 2 de enero del 2021 y el 1º de enero del 2022, se reportaron 46.644 casos nuevos. De estos, la mayoría se concentró en la región Central, con un 31,7% de los casos, en Bogotá, D.C. con 20,8% y en la Pacífica, con el 18,2%. El 58,4% de los casos nuevos reportados fueron diagnosticados en las mujeres. Entre los casos nuevos reportados de los tipos de cáncer priorizados, en los hombres el cáncer de próstata se presentó en el 21,6%, seguido por el colorrectal (9,4%) y el gástrico (7,1%). En el caso de las mujeres, el cáncer de mama fue el más frecuente con el 29,7%, seguido por el de cérvix y el colorrectal, con el 8,4% y 7,6%, respectivamente. Según los grupos de edad, el 2,0% de los casos nuevos reportados, se presentó en la población menor de 18 años. En adultos, la mayor parte de los casos ocurrieron en personas mayores de 60 años (56,6%) (Ministerio de Salud y Protección Social Colombia, 2022).

Entre los factores de riesgo más importantes para el cáncer están: Factores genéticos, metabólicos como la obesidad, dieta poco saludable, infecciones crónicas como el virus del papiloma Humano, Hepatitis B y C, Expositivos como el tabaco (O’Keeffe et al. 2018), carcinógenos ambientales, radiación, asbesto, metales pesados (arsénico, cromo y níquel), hidrocarburos aromáticos policíclicos y consumo de Alcohol.

Los biomarcadores tumorales es un término usado para describir muchos marcadores potenciales de cáncer durante su presentación y progresión, pueden ser proteínas, DNA, RNA e idealmente debe ser específico a un tipo particular de tumor, no deben estar presentes en tejidos normales ni en individuos sanos y deben reflejar actividad tumoral. En la práctica clínica Oncológica solo ciertos Biomarcadores séricos tumorales son útiles para el seguimiento, ejemplo Antígeno prostático específico (PSA) en el seguimiento a pacientes con cáncer de Próstata, CA 125 en cáncer de Ovario, CA 19.9 en cáncer de Páncreas, Antígeno carcinoembrionario en cáncer de colon, Gonadotropina coriónica y alfafetoproteína en cáncer de testículo; La mayoría de los tumores sólidos restantes carecen de Biomarcadores de seguimiento. (Chatterjee SK.,2005).

Por lo anterior es fundamental que pueda desarrollarse un biomarcador tumoral que establezcan patrones de comportamiento biológico, predictivos de respuesta al tratamiento o que puedan establecer una progresión tumoral y por ende en la toma de decisiones terapéuticas más precisas, lo que se traduciría en mejoría en la calidad de vida y éxito en los tratamientos optimizando además los recursos del sistema de salud. Adicionalmente es necesario que los biomarcadores utilizados permitan determinar el estado tumoral sin la necesidad de implementar procedimientos invasivos como biopsias solidas.

Por tal razón se ha propuesto la proteína PD-L1, que es una proteína tumoral que desempeña un papel fundamental de regulación en el sistema inmunológico del microambiente tumoral. Es una proteína transmembrana expresada en la superficie de ciertas células, incluidas las células tumorales y del sistema inmune, y cuyas vesículas extracelulares también expresan dicha proteína, que podría ser cuantificada como biopsia líquida en sangre, orina, sudor, saliva, entre otras. (Chen, G., et al 2018).

3. Justificación

En la incansable búsqueda de optimizar las estrategias de seguimiento oncológico, es imperativo explorar alternativas basadas en biomarcadores tumorales distintos al convencional examen clínico y diagnóstico por imágenes (Litvin et al., 2020). Estas herramientas, aunque fundamentales, a menudo no logran detectar la evolución de las neoplasias de manera eficiente. La revolución de las tecnologías genómicas y proteómicas ha abierto la posibilidad de identificar patrones moleculares que delinean las vías biológicas de escape y resistencia generadas por los tumores, ofreciendo blancos terapéuticos susceptibles de intervención específica (Litvin et al., 2020).

Este cambio de paradigma plantea un desafío significativo en el seguimiento de los pacientes, transformando radicalmente el enfoque, especialmente en el tratamiento del cáncer de mama y otros tipos de neoplasias. La capacidad de reconocer moléculas específicas mediante dispositivos que cuantifican su concentración, y que están directamente asociadas o integradas al cáncer, proporciona una precisión sin precedentes en el diagnóstico y seguimiento.

El cáncer, en esencia, representa la habilidad de una célula para eludir los mecanismos moleculares que regulan la replicación y la apoptosis, así como para evadir la respuesta inmune a través de la regulación de diversos genes. Algunos de estos productos génicos son expresados en microvesículas llamadas exosomas, los cuales se postulan como portadores ideales de biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento del cáncer (Duréndez-Sáez, E., 2022). La detección temprana de estos biomarcadores no solo aumenta la probabilidad de un tratamiento más preciso, sino que también permite un seguimiento continuo, potenciando la esperanza de vida de los individuos afectados.

Entre los biomarcadores emergentes, el ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1) destaca por su papel crucial en el pronóstico del cáncer. PD-L1, responsable de inhibir la activación de los linfocitos T al unirse a su receptor PD-1, se asocia con una baja supervivencia en cáncer de mama, especialmente en casos de tumores grandes, alto grado de proliferación, y aquellos con receptores de estrógeno (ER) negativos y HER-2 positivos (Litvin et al., 2020). Este biomarcador, expresado en

aproximadamente el 20% de los cánceres triple negativos, que son conocidos por su pronóstico agresivo, se perfila como un indicador crucial para orientar estrategias terapéuticas personalizadas.

La proteína PD-L1 presente en los exosomas es una alternativa como biomarcador tumoral en pacientes con neoplasias avanzadas, y puede tener un alto nivel de precisión en su medición puesto que determinaría la presencia o no de los exosomas tumorales que expresen dicha proteína biopsias líquidas como suero y orina, lo que permite su fácil determinación por el laboratorio clínico y fácil interpretación por parte del médico, permitiendo tener acceso a la información de la expresión de PD-L1 tumoral a partir de exosomas secretados por las células malignas y su comportamiento posterior al inicio del tratamiento con medicamentos que bloquean dicho receptor en el contexto de un tratamiento sistémico contra el cáncer de tal modo que pueda ser evaluado en tiempo real y establecer la efectividad o no de los tratamientos oncológicos instaurados.

4. Marco teórico

El Instituto nacional de Salud de USA (NIH) estableció la definición de biomarcador como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, etc., objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica, (Chatterjee & Zetter, 2005), El elemento biológico debe generar una señal medible en las plataformas bio sensibles, los cuales pueden ser fragmentos de ADN, enzimas, anticuerpos, proteínas, fármacos, toxinas, receptores celulares, inclusive células completas y tejidos (Marrugo-Ramírez., et al. 2018).

La inmunoterapia en cáncer ha emergido recientemente como una herramienta adicional en el espectro de tratamiento que contribuye al ataque del sistema inmunológico contra el cáncer. Particularmente, los Drs James P. Allison y Tasuku Honjo ganaron el Premio Nobel de Medicina en 2018, por descubrir un tratamiento con anticuerpo monoclonal Anti PD-1 contra el cáncer, al suprimir la inmunomodulación negativa en esta vía de bloqueo (Li, Z., Song, 2018).

Un tumor no es simplemente una masa celular compuesta por células malignas, posee una gran cantidad de células del sistema inmune y del estroma, reclutadas y transformadas por las propias células malignas, lo que conforman el microambiente tumoral, además constituido por: vasos que lo nutren, matriz extracelular, una compleja red paracrina de moléculas de señalización que sostiene las conexiones internas del microambiente, incluidos factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas entre otros (Wang M., 2017).

El sistema inmunológico está compuesto por varios tipos celulares que protegen contra patógenos invasores infecciosos y células tumorales, linfocitos T efectores, linfocitos T reguladores, linfocitos B reguladores (Tregs/Bregs), linfocitos Natural Killer (NK), células dendríticas, células mieloides supresoras y macrófagos entre otros.

Los linfocitos T que infiltran el tumor son células efectoras importantes en el sistema inmunológico y se pueden dividir en células T CD4 + (células T colaboradoras) y células T CD8 + (células T citotóxicas), estas células pueden secretar citoquinas antitumorales como interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-17 e IL-2.

En contraste, los linfocitos T regulatorios, B regulatorios, las células mieloides supresoras y macrófagos M2 son células inmunosupresoras que secretan IL-10, IL-35 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), suprimiendo la respuesta inmune de los linfocitos T y así contrarrestar el daño de la activación excesiva de las células T Antitumorales, contribuyendo así al desarrollo de los tumores. (Wang M., 2017)

Uno de los mecanismos de resistencia antitumoral generados intracelularmente está relacionado con un mecanismo conocido como puntos de control inmune (*Immune check points*), los cuales son reguladores que en condiciones normales mantienen la homeostasis y previenen la autoinmunidad, son vías estimuladoras e inhibitoras que mantienen la autotolerancia con relación a la activación de los linfocitos T, regulan la magnitud y duración de la respuesta inmune. Durante la progresión del cáncer, esta inhibición de la función de los linfocitos T efectoras está alterada en una gran proporción de tumores, promoviendo así el crecimiento tumoral; uno de estos controles inmunológicos está representado en la vía de muerte celular Programada por el receptor 1(PD-1) y su ligando 1 (PD-L1). PD-1 se compone de un dominio extracelular similar a IgV, una región transmembrana hidrófoba y una región intracelular, los residuos de aminoácidos C- terminales y N-terminales del dominio intracelular con 2 bases de tirosina (Salmaninejad, A., 2019).

La molécula PD-1 es un inhibidor de las respuestas inmunitarias tanto adaptativas como innatas, y se expresa en linfocitos T activados, asesinos naturales (NK), macrófagos, células dendríticas (DC) y monocitos. Es de destacar que PD-1 se expresa en gran medida en células T específicas de tumores. Los factores de transcripción como el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), NOTCH, la proteína de caja de Forkhead (FOXO1) y el factor regulador 9 del interferón (IFN) (IRF9) pueden desencadenar la transcripción de PD-1 (Ji et al., 2015).

El ligando PD-L1 también conocido como CD279 y B7-H1, pertenece a la serie B7 y es una glicoproteína transmembrana tipo 1 de 33 kDa que contiene 290 aminoácidos con dominios Ig e IgC en su región extracelular, (Sanmamed et al., 2014), PD-L1 suele expresarse en macrófagos, algunas células T activadas y células B, Células dendríticas y algunas células epiteliales, particularmente en condiciones inflamatorias; Las células tumorales que expresan PD-L1 como un "mecanismo inmunitario adaptativo" para escapar de las respuestas antitumorales, está asociado con un entorno inmunológico rico en células T CD8,

producción de citoquinas Th1 así como interferones y características específicas de expresión génica. (Ji et al., 2015). Actúa como factor pro-tumorigénico, mediante la unión a sus receptores y activando las vías de señalización proliferativas y de supervivencia, indicando además que PD-L1 está implicado en la progresión tumoral. Se ha demostrado que PD-L1 ejerce efectos proliferativos no inmunes en una variedad de tipos de células tumorales. PD-L1 induce la transición epitelial a mesenquimal (EMT) y fenotipos similares a células madre en células de cáncer renal, lo que indica que la presencia de la vía intrínseca de PD-L1 promueve la progresión del cáncer de riñón. (Nunes-Xavier et al., 2019)

PD-1 es un receptor específico de PD-L1. Después de unirse, PD-1 tiene dos sitios de fosforilación independientes: el motivo inhibidor inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y el motivo de cambio inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM). El ITSM es un sitio estructural importante para que PD-1 ejerza su función biológica: cuando PD-1 se une a PD-L1, la región ITSM se fosforila para activar una serie de vías de señalización intracelular y lograr una inhibición inmunológica eficiente. La interacción PD-1/PD-L1 puede inhibir la activación de linfocitos, reducir la secreción de citoquinas de linfocitos y por lo tanto, promover la apoptosis de linfocitos promoviendo el crecimiento tumoral.

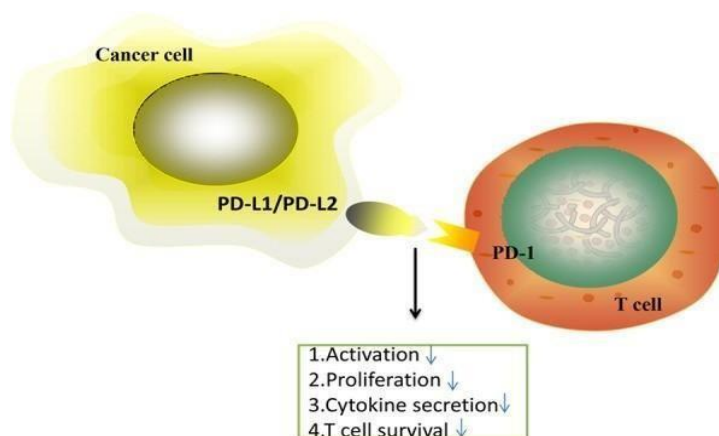


Figura 4-1. Eje PD-1/PD-L1 inhibe la activación, proliferación, supervivencia y secreción de citoquinas dentro de las células de cáncer (Han et al., 2020)

De modo similar a la expresión de PD-L1 en las células tumorales, los exosomas tumorales (vesículas extracelulares secretadas por los tumores), expresan esta misma molécula y tienen efecto inmunosupresor sobre los Linfocitos T CD8, facilitando el crecimiento tumoral, siendo estos niveles circulantes de PD-L1 exosomal, predictivos de respuesta o no a los diferentes tratamientos antitumorales (Chen et al., 2018).

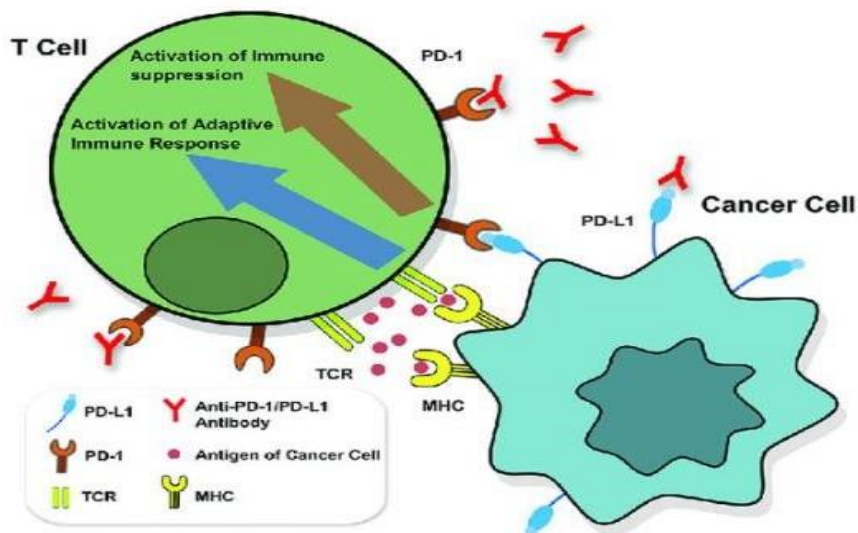


Figura 4-2: Identificación de PD-1 / PD-L1. La unión de TCR y MHC activa la respuesta inmune adaptativa. La unión de PD1 y PD-L1 puede prevenir la transducción de señales de las células T para inhibir la respuesta inmune. mientras que el anticuerpo anti-PD-1 / PD- L1 puede revertir la inhibición. TCR, receptor de células T (Zhang et al., 2020).

Los exosomas son vesículas extracelulares entre 30 y 200 nm son producidas tanto por células normales como por células tumorales, están formadas de una capa lipídica y transportan información importante desde el punto de vista biológico en relación con: proteínas, RNAm, microRNA, DNA etc.

Cualquier clase de célula puede secretar exosomas (p. Ej., Células inmunitarias, células epiteliales, células endoteliales y células tumorales) y la composición de la carga dentro del exosoma varía mucho dependiendo de la célula de origen, los exosomas pueden participar en diversos procesos fisiológicos y patológicos, como presentación antigénica, reparación de tejidos, comunicación intercelular y en el caso de exosomas tumorales en la progresión. (Whiteside T L. 2018).

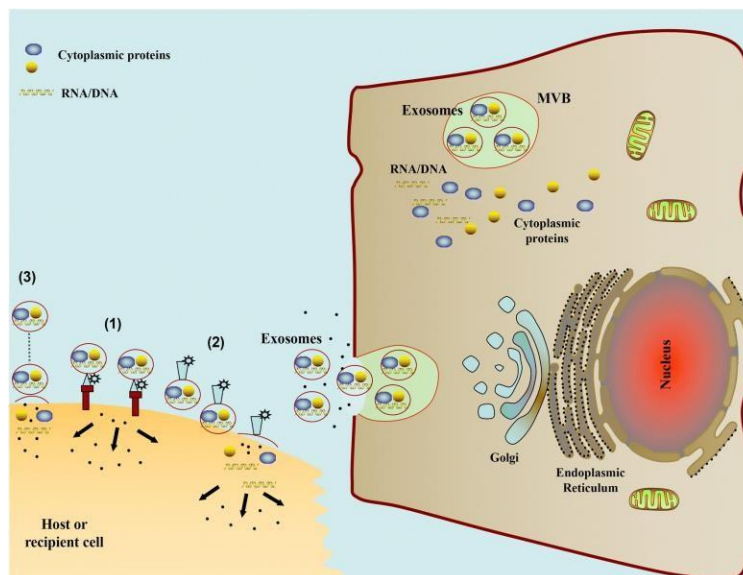


Figura 4-3: Vías involucradas en la comunicación célula a célula por exosomas. (1) Las células reciben la señal de los exosomas vía ligandos de unión directos de superficie. (2) Los Exosomas transfieren receptores activados a las células receptoras. (3) Los Exosomas pueden reprogramar epigenéticamente las células receptoras aportando proteínas lípidos y RNAs funcionales (Zhang Y, 2019)

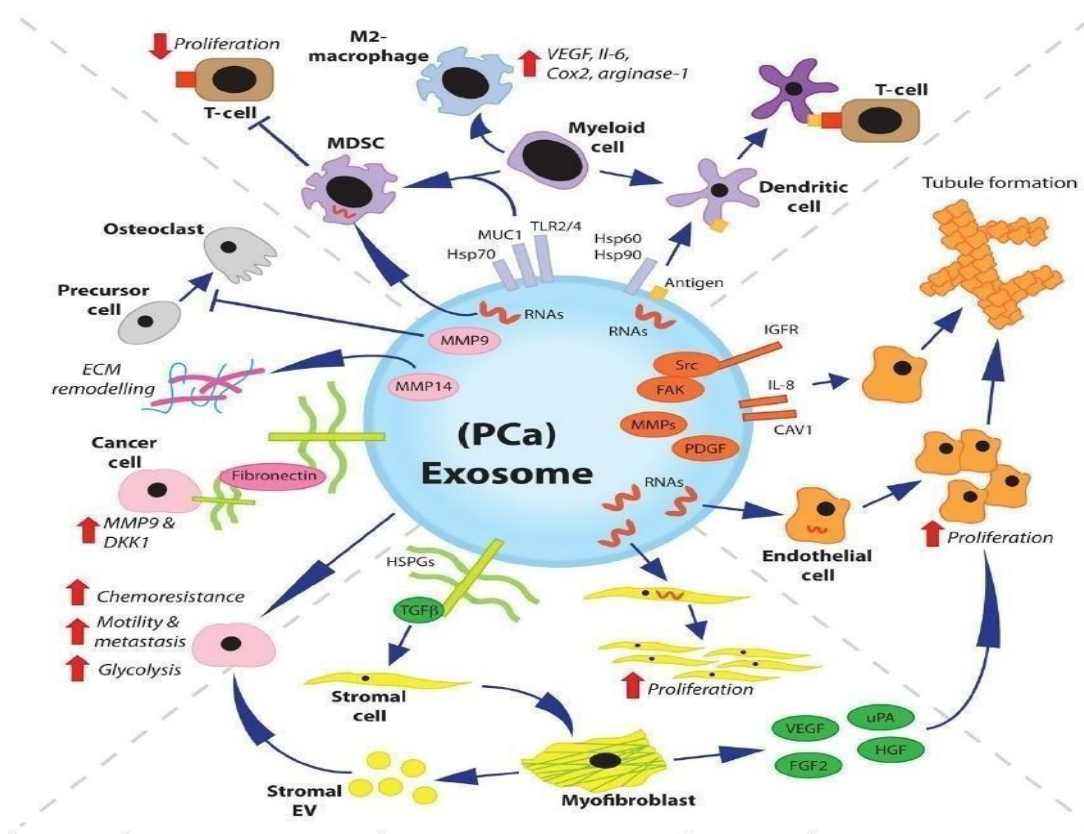


Figura 4-4. Modulación de la respuesta inmune por exosomas. Los exosomas derivados de células tumorales pueden modular el sistema inmunológico, transmitiendo antígenos tumorales a las células dendríticas, o diferenciar directamente las células mieloides hacia fenotipos de macrófagos células (M2). La liberación de ARN mediada por exosomas puede inducir la proliferación de células endoteliales y las proteínas asociadas a exosomas pueden inducir la formación de túbulos endoteliales. El Factor transformante beta exosómico puede inducir la diferenciación de fibroblastos estromales o Célula mesenquimal hacia un fenotipo pro-angiogénico y de soporte tumoral similar a miofibroblastos. Las vesículas extracelulares derivadas de células del estroma pueden transferir la quimiorresistencia a las células cancerosas y modular tanto la metástasis como el metabolismo de las células cancerosas. La progresión de la enfermedad se ve reforzada por los exosomas del cáncer, que impulsan la remodelación de la matriz extracelular y perjudican la diferenciación osteoclástica. EV: vesículas extracelulares; DC: células dendríticas; MDSC: célula supresora derivada de mieloides; MSC: célula madre mesenquimatosa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; MMP: metaloproteínasa de matriz; FAK: quinasa de adhesión focal; IGFR: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina; Src: protooncogén tirosina-proteína quinasa Src; FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos 2; uPA: activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; TGF: factor de crecimiento transformante beta. (Shephard, 2017).

El contenido proteico de los exosomas se puede utilizar para su caracterización, purificación y cuantificación. Algunas proteínas que se pueden encontrar en los exosomas independientemente de su origen y se consideran "marcadores de exosomas". Estos incluyen TSG101, Alix, Rab GTPasas, proteínas de choque térmico (HSP70, HSP90), integrinas, tetraspaninas (CD9, CD63, CD81). Además, los exosomas pueden contener material genético como ARNm, ARN no codificante largo (lncRNA) y microARN (miARN). (Melo, S. A., 2014).

Una de las funciones de los exosomas es modular el microambiente tumoral por varios mecanismos, entre otros, angiogénesis, activando células estromales que dan soporte a los tumores, modulan células mieloides supresoras, vuelven células inmunes en fenotipo inflamatorio, regulan el metabolismo de las células tumorales, contribuyen a la metástasis y pueden transferir resistencia a agentes quimioterapéuticos. (Zhang et al., 2015). Los exosomas son mediadores clave de la comunicación intercelular en el microambiente tumoral primario y en lesiones metastásicas, proporcionando un medio para mantener el crecimiento y la agresividad del tumor (Zhang et al., 2015).

Los exosomas tumorales no sólo se encuentran en el microambiente tumoral, sino que además tienen la propiedad de moverse vía sanguínea, lo cual permitiría aislarlos para el seguimiento biológico de los tumores activos. (Rabinowits et al., 2009).

Los exosomas se pueden evaluar a partir de biopsias líquidas, de tal forma que dan información importante acerca de la actividad tumoral siendo así una herramienta útil como biomarcador tumoral. (Zhang et al., 2015). Los estudios de exosomas derivados de plasma en pacientes con tumores malignos, reflejan en parte el contenido molecular y genético de las células tumorales de donde se originaron, de modo similar, la carga molecular de los exosomas derivados de células inmunes podría servir como biomarcadores de disfunción inmunológica, es factible que al analizar los exosomas tumorales o los derivados de las células inmunes puedan evaluar diversos aspectos de la evolución del tumor, del pronóstico y la eficacia terapéutica. (Whiteside, 2018).

Numerosos resultados han evaluado exosomas derivados de tumores y su carga específica como reguladores clave en la formación de nichos premetastásicos, el escape tumoral y la regulación de los linfocitos T efectores. (Abusamra et al., 2005). Además se ha demostrado la expresión en los exosomas tumorales moléculas inmunosupresoras como el ligando Fas (FasL) el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y la interleucina 10 (IL-10), factores de neoangiogénesis, así como factores condicionantes del microambiente, como el factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1), prostaglandina E2 (PGE2) y ectoenzimas involucradas en la vía de la adenosina (CD39 y CD73) (Whiteside, 2016).

Los exosomas tumorales promueven la expansión y actividad de los inhibidores de la respuesta inmune (Treg y MDSC). (Filipazzi et al., 2012). De esta manera, los exosomas que expresan PD-L1 (exoPD-L1) aislados de líneas celulares de cáncer de pulmón inhiben la producción de interferón- γ (IFN- γ) por células T Jurkat *in vitro*, así como el suero de pacientes con una alta proporción de exosomas PD-L1+ también inhibe la producción de IL-2 e IFN- γ *in vitro*. (Kim et al., 2019). Cuando el nivel de diferentes tipos de PD-L1 (total soluble, microvesicular, exosomal y secretado) fueron analizadas antes y después de la inmunoterapia, los niveles de exo PD-L1, pero no otras formas de PD-L1, distinguió los pacientes con melanoma metastásico que responderían al bloqueo de PD-1 en forma temprana posterior al inicio de la inmunoterapia, la magnitud de aumento en exo PD-L1 fue significativamente mayor en respondedores, mientras que hubo una diferencia no significativa observada para el total, PD-L1 exosomal y sin membrana, sugiriendo que exoPD-L1 es un marcador de activación inmune adaptativa. Sin embargo, es desconocido

si este aumento en exoPD-L1 deriva de la liberación de exosomas del tumor o derivado de exosomas de células inmunes en el melanoma, o ambos (Chen et al., 2018).

El presente estudio tiene diferentes objetivos que impactaran en la evolución clínica de los pacientes, optimizando los manejos y mejorando la calidad de vida, al desarrollar un Biomarcador sensible a bajo costo los médicos tendrán una herramienta de trabajo predictiva y pronóstica, los pacientes se podrían favorecer en la asignación de un tratamiento, así como desde el punto de vista económico servirá como para optimizar recursos en salud y definir en forma temprana qué pacientes se están beneficiando o no del tratamiento; inclusive poder proponer esquemas de manejo más cortos en caso de respuestas completas al tratamiento lo cual evitaría el exceso en los tratamientos que también se convierte en un problema, puesto que ante el advenimiento de la Inmunoterapia y la búsqueda de la posible cura del cáncer, el realizar tratamientos tan extensos e innecesarios conlleva a más posibilidades de efectos tóxicos de los medicamentos sin mayor beneficio en el resultado final.

El poder encontrar respuestas tumorales completas en forma adecuada y corroboradas por parámetros biológicos como los que estamos planteando asociado a los parámetros clínicos y de imágenes impactaría en forma trascendental la calidad de vida de muchos de nuestros pacientes, los cuales podrían inclusive retornar a su vida cotidiana y productiva generando más bienestar y progreso lo cual no era posible hasta que la Inmunoterapia se posicionó como uno de los mejores avances científicos de los últimos años en la oncología, también podría detectar en forma precoz los pacientes que no están respondiendo o inclusive progresando para definir si los mismos se benefician o no de continuar el tratamiento o cambiar a otros esquemas terapéuticos.

5. Hipótesis y Objetivos

5.1. Hipótesis

Los niveles de la proteína PD-L1 en exosomas en líneas celulares y en biopsias líquidas de plasma sanguíneo y orina, son un potencial biomarcador en pacientes con neoplasias avanzadas

5.2. Objetivos

5.2.1. Objetivo General

Evaluar los niveles de la proteína PD-L1 exosomal como un posible biomarcador en muestras líquidas de pacientes en estadios avanzados de cáncer.

5.2.2. Objetivos Específicos

- Implementar la caracterización bioquímica y morfológica de exosomas de células tumorales.
- Evaluar los niveles de la proteína PD-L1 soluble y exosomal en medio de cultivo de células tumorales de cáncer.
- Determinar los niveles de PD-L1 soluble y exosomal en biopsias líquidas de pacientes con cáncer en estadios avanzados.

6. Metodología

6.1. Diseño experimental

En este proyecto se evaluó la proteína PD-L1 como un biomarcador específico tumoral. Inicialmente *in vitro* en una línea celular de cáncer de pulmón, luego se determinó en biopsias líquidas de pacientes con cáncer en estadios avanzados.

Las biopsias líquidas (sangre y orina) y tumorales fueron obtenidas de pacientes pertenecientes a la institución IPS Centro Oncológico de Antioquia Ubicado en Envigado Antioquia. A los pacientes se les informó el objetivo del estudio de forma verbal y escrita, así como los riesgos inherentes a la toma de muestra, se diligenció y firmaron el consentimiento informado donde expresaron su participación voluntaria y espontánea en el estudio.

Este procedimiento fue realizado bajo la supervisión de un profesional del área de la salud. Estas células no tuvieron como destino ningún tipo de banco de células, y al finalizar los experimentos, las células fueron descartadas como desecho biológico en las instituciones clínicas y en la Universidad Nacional de Colombia. Dado que tales muestras fueron de utilidad para el desarrollo del proyecto, la Universidad Nacional siguió el protocolo de bioseguridad para los desechos generados en el procesamiento de las muestras, las cuales nunca representaron riesgo biológico ni causaron accidentes biológicos a los investigadores ni al medio ambiente; implementado los protocolos de la Dirección Nacional de Laboratorios siguiendo lo establecido por el estatuto metropolitano del medio ambiente del Valle de Aburrá (Acuerdo 007 de mayo 17 de 1993 del Concejo de Medellín), el código sanitario nacional (Ley 9 de 1979), el estatuto de seguridad industrial (Resolución 2.400 de 1979) y demás normas y recomendaciones internacionales que regulan la materia. Además, en el laboratorio se implementó las regulaciones para la recolección, almacenamiento y transporte biológico tanto del material obtenido como del procesado por medio de la Resolución Número 01164 de 2002.

6.2. Consideraciones éticas

Esta propuesta de investigación fue evaluada por el comité ético certificado de IPS (institución prestadora de salud) Clínica de Occidente perteneciente a la empresa Quiron Salud, y se desarrolló en base al manual de buenas prácticas de investigación, fundamentadas en los principios básicos de honestidad, responsabilidad y rigor. Nos comprometimos con la integridad de la investigación, garantizando los siguientes aspectos:

Honestidad científica en el diseño experimental, la propuesta metodológica, ejecución de las actividades, análisis de datos y presentación de resultados de investigación.

Reconocimiento de las contribuciones de todos los autores en los resultados del proyecto.

Cumplimiento de las responsabilidades académicas adquiridas por cada miembro del equipo de trabajo, para mantener los más altos estándares de conducta en el aprendizaje, la enseñanza y la investigación, exigiendo que todos sus miembros actúen responsablemente a fin de promover la integridad académica.

La no omisión de resultados obtenidos en la investigación que contradigan las hipótesis planteadas.

La no publicación de los mismos datos o resultados en dos o más artículos o eventos académicos distintos.

Respeto de la propiedad intelectual, citando adecuadamente todas las referencias consultadas para el desarrollo de la investigación.

Se realizó un análisis exploratorio de pacientes de la consulta externa del centro Oncológico de Antioquia, en el municipio de Envigado Antioquia, en forma aleatoria con Diagnóstico de neoplasias avanzadas en total 4: Paciente No 1 Diagnóstico Carcinoma de Vejiga Estadio IV; Paciente No 2 Diagnóstico Cáncer Escamocelular de Faringe Estadio IV; Paciente No 3 Diagnóstico Cáncer Escamocelular de Cuello Uterino Estadio IV y Paciente

No 4, Diagnostico Adenocarcinoma de vías biliares Estadio IV, los pacientes fueron informados del objetivo del presente estudio, el cual se desarrolló bajo estrictas normas éticas en la manipulación y desecho de las muestras, de la utilidad del estudio y bajo estrictas normas éticas y de manejo de las muestras.

No se pretendió realizar algún tipo de comercialización o manipulación de resultados para favorecer a ninguna empresa farmacéutica siendo las normas estrictas y rigurosas de la investigación Clínica.

6.3. Cultivo celular y aislamiento de exosomas

Las células A549 fueron cultivadas en un frasco T25 con medio DMEM suplementado con solución antibiótico-antimicótico 1X y 10% de SBF (Suero bovino fetal), se hizo la siembra inicial de 7000 células/cm², con un volumen total de 5 mL de medio. Una vez se alcanza una confluencia del 80% se realiza el cambio de medio a medio sin suplemento de SBF y se dejaron en incubación por 48 horas (Figura 6-1). Al terminar el periodo de incubación cuando se tenían aproximadamente 40000 células/cm² se tomó el medio condicionado (MC) fue recolectado y se purificaron los exosomas (Figura 6-2), centrifugando el MC a 2000 x g por 10 minutos y luego el sobrenadante se filtró en acrodisco de 0,22 µm.

Como control negativo de la expresión de PD-L1 se usaron células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical (UC-MSC), que fueron donadas por la empresa Exosomas SAS, provenientes de donantes voluntarios bajo consentimientos informados y que cuentan con todas las evaluaciones de calidad y caracterización. Las células fueron cultivadas bajo las mismas condiciones en frascos T25, pero con medio DMEM bajo en glucosa suplementado con antibiótico-antimicótico 1X y 10% de SBF, al llegar a 80% de confluencia se reemplaza el medio sin suplemento de SBF para luego a las 48 recolectar el medio condicionado y proceder a la purificación de las vesículas extracelulares.

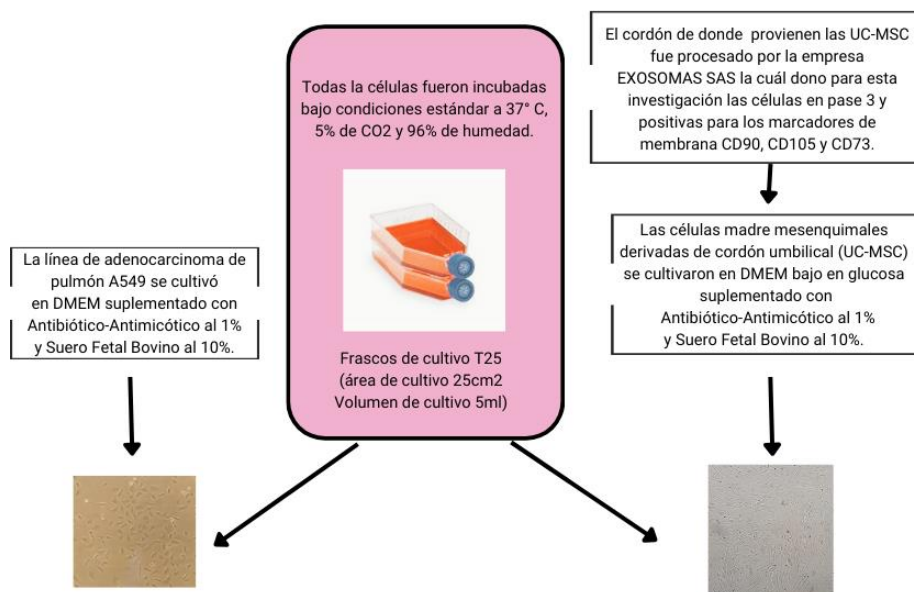


Figura 6-1. Cultivo celular de las líneas A549 y UC-MSC

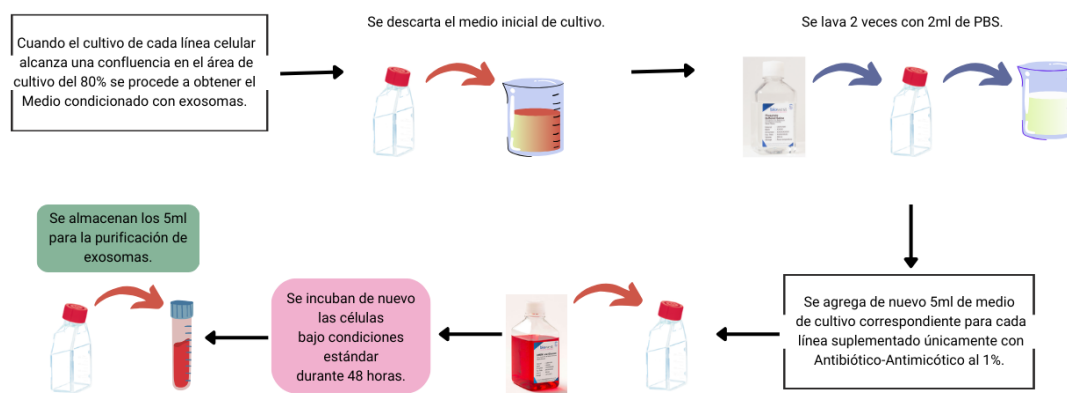


Figura 6-2. Metodología de recolección de exosomas derivados de líneas celulares

6.4. Purificación y caracterización de exosomas

Para separar los exosomas (de cultivo celular y biopsias líquidas) de las proteínas solubles y de agregados proteicos, se usaron dos técnicas de purificación de exosomas (Columna de afinidad y Ultrafiltración), la columna de afinidad utilizada fue Capturem™ Exosome Isolation Kit, en la cual se cargan hasta 5 mL de la muestra (producto de 1 millón de células aproximadamente, que equivalen a su vez a 200 mil células/mL). Se hace una primera clarificación con la columna de limpieza centrifugando a 1000 x g por 3 minutos. Luego, el

filtrado se carga en la columna de afinidad, la cual tiene una membrana conjugada con compuestos basados en la afinidad por la lectina para la separación de vesículas extracelulares. Se centrifuga a 1000 x g por 2 minutos, luego se agrega 10 mL de buffer de lavado para volver a centrifugar a 1000 x g por 2 minutos y finalmente se cambia el tubo colector para agregar el 500 μ L de buffer de elusión y se centrifuga otros 2 minutos a 1000 x g. Ya el filtrado contendrá los exosomas concentrados en aproximadamente 500 μ L de buffer. Para la técnica de ultrafiltración, hasta 4 mL de muestra con exosomas (producto de 800 mil células aproximadamente) fueron cargados en un Amicon Ultra 4 de 30kDa, se centrifuga a 4000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente, el retenido que es de aproximadamente 400 μ L contendrá la muestra de exosomas mientras que el filtrado tendrá las proteínas solubles.

Los exosomas purificados fueron caracterizados por un análisis de seguimiento de partículas (Nanoparticle Tracking Analysis) en un equipo NanoSight NS300, donde se realizó una dilución 1:10 en buffer PBS, se usó el láser verde, con 5 tomas de videos de 60 segundos independientes a un nivel de cámara de 13, tomando 1800 frames por lectura, con un threshold de 6 y a una temperatura de 25 °C. Los análisis de imágenes fueron ajustados por el Software (finite track-length adjusted - FTLA), el cual permite determinar el número de partículas por volumen (ml), el tamaño promedio del exosomas y la concentración de exosomas. Con base en este análisis se realizó una cuantificación de proteína total luego de lisar la muestra con buffer RIPA relación 1:1, por medio de Bradford Protein Assay Kit, realizando una curva de calibración con BSA entre 100 y 300 μ g/mL y agregando 20 μ L de la muestra o sus diluciones para luego agregar 200 μ L de reactivo de Bradford en platos de 96. Cuando el Azul de Coomassie se intercala en las proteínas, genera un complejo de color azul que puede ser leída una absorbancia a 595 nm. Posteriormente, se realizó una cuantificación de acetilcolinesterasa por medio de Acetylcholinesterase Assay Kit (Abcam) en donde brevemente en platos de 96 se mezclan 50 μ L de la mezcla de acetilcolina y el sustrato DTNB con 50 μ L de la muestra problema o las diluciones patrón de acetilcolinesterasa, se deja incubando 30 minutos para luego leer la absorbancia a 410 nm.

Finalmente, se hicieron registros por TEM (Microscopia electrónica de transmisión) y DLS (Dynamic Light Scattering); para evaluar la morfología de los exosomas por TEM 100 μ L de exosomas fueron fijados con 2% de glutaraldehído a razón de 1:1, luego se montó la muestra en rejillas de formav cubiertas de carbono, y se tiñen usando acetato de uranilo

al 1,75% durante 7 minutos, luego de secar durante 2 horas se realizaron al menos 20 lecturas en posiciones aleatorias. Para el ensayo con DLS, se ajustaron los exosomas a una concentración de 50 µg/ml, bajo las condiciones de un láser de helio y neón a 633 nm, 20 mW, una temperatura constante de 25 °C. Se tomaron 5 capturas por muestra con una duración total de 50 segundos y con una razón de conteo de 113 y un nivel del atenuador de 11.

6.5. Biopsias tumorales y líquidas.

Los criterios de inclusión de los pacientes al estudio se basaron en una población con neoplasias malignas avanzadas en estadios IV según la clasificación Internacional TNM, se incluyeron pacientes mayores de 18 años sin alteraciones cognitivas y en plena facultad mental y en toma de decisiones, cuyas biopsias tumorales, presentaron un porcentaje de expresión por inmunohistoquímica de PD-L1 CPS mayor al 10% en 2 pacientes y 2 pacientes sin reporte de PD-L1; dichos pacientes, objeto del presente estudio, no estaban recibiendo tratamiento con inmunoterapia al momento de la toma de las muestras, se definió de esta manera con el fin de evitar sesgos en la expresión de PD-L1 tumoral que podría ser modificado por la influencia de los tratamientos en dicha expresión. Adicionalmente, los pacientes reportaron que no presentaron síntomas de gripa o fiebre en los últimos 20 días.

En la selección de los pacientes no se presentó discriminación de género, condición social, étnica o demográfica. Como grupo control se solicitó la participación de un individuo sano, se excluyeron pacientes mujeres embarazadas, menores de 18 años o con trastornos cognitivos o pacientes que hubiesen recibido previamente manejo quimioterápico o inmunoterápico o que hayan tenido síntomas de enfermedad como gripa en los últimos 20 días, o estén consumiendo medicamentos para enfermedades inflamatorias agudas.

El Score de PD-L1 que se utilizó es el que está establecido por la FDA (*Food and Drug Administration*) y por las sociedades científicas de patología a nivel Internacional y establece un rango (Tumor proportion score o TPS) que se usa para caracterizar el tumor en 3 categorías TPS <1% (negativo para PD-L1), del 1% al 49% (expresión baja a moderada) y ≥50% (expresión alta) (NCCN Guidelines 2021) Existe un grupo de neoplasias que a pesar de no realizarse el PD-L1 en biopsias tumorales de rutina se ven beneficiados

del uso de inmunoterapia (Antoni Ribas et al., 2016)). Las biopsias líquidas (sangre y orina) de pacientes se obtuvieron al diagnóstico, previo al manejo oncológico, y utilizadas para la cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble. La sangre periférica se extrajo en tubos de heparina, se centrifugo a 2500 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, el suero se recolecto y tanto la orina como el suero se centrifugo a 2500 x g por 15 minutos a 4 °C para eliminar desechos. En el presente estudio se escogió un CPS del 10% para expresión en biopsia tumoral que es un porcentaje significativo de expresión.

6.6. Efecto de la inmunomodulación de los exosomas

Como control a la expresión de la proteína exosomal PD-L1 se utilizaron aquellos que han sido purificados por medio de columna de afinidad como se describe anteriormente. Adicionalmente para verificar que la PD-L1 es funcional se realizó un ensayo de inmunomodulación con el cultivo de células mononucleares de sangre periférica. Para este ensayo, de un individuo sano voluntario se extrajo en tubos de citrato dextrosa, aproximadamente 10 mL de sangre, posteriormente se realizó un aislamiento de las células mononucleares por con Histopaque-1077 (Sigma) en donde la sangre se colocó sobre el gradiente de densidad, luego de centrifugar a 400 x g por 30 minutos se retiró la capa correspondiente a los leucocitos. Posteriormente estos fueron sembrados a una densidad de 1 millón/mL en 5 mL de medio RPMI suplementado con 10% SBF, 1% de antibiótico-antimicótico y estimulados con 1% de fitohematoglutamina (PHA). El cultivo se realizó a 37 °C y con una atmosfera de CO₂ del 5%. Luego de 3 días de estimulación, se sembraron cambio el medio de cultivo y se sembraron por triplicado 200 µL de linfocitos en platos de 96 pozos a una densidad de 1 millón/mL, adicionalmente se agregó 1x10⁹ exosomas en total a cada uno de los pozos y se dejó un grupo como control de proliferación. El cultivo se realizó por otros 3 días y luego hizo un conteo total de linfocitos en cámara de Neubauer para calcular la cantidad crecimiento y un porcentaje de proliferación comparando con el control (Figura 6-3).

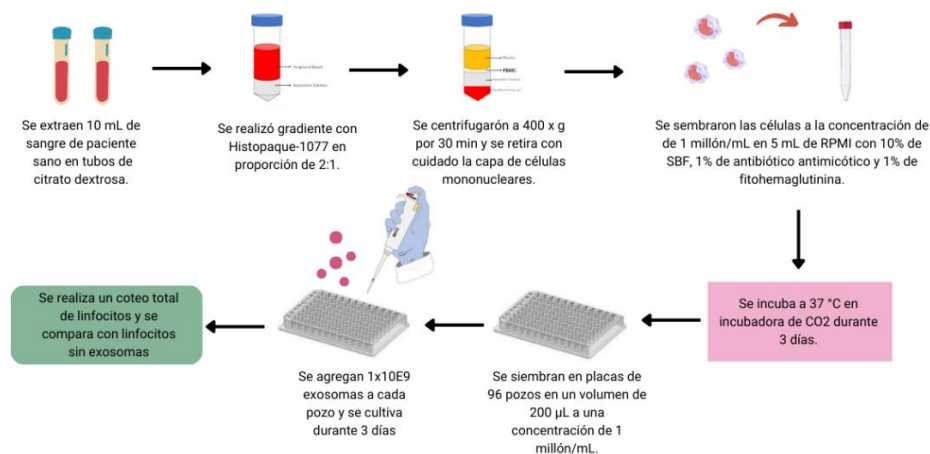


Figura 6-3. Metodología del ensayo del efecto inmunomodulador

6.7. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble

Para la cuantificación de PD-L1 soluble (no asociado a exosomas), las diferentes muestras líquidas provenientes de los pacientes fueron filtradas a través de un sistema de ultrafiltración Amicon® Ultra-15 filter de 10 kDa MWCO como se describió previamente y en donde en el filtrado contiene las proteínas solubles no asociadas a los exosomas, mientras que en el retenido tiene los exosomas.

Los exosomas obtenidos de las diferentes muestras líquidas (medio de cultivo, sangre y orina), y las fracciones solubles, fueron utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína PD-L1 exosomal mediante ELISA (Human PD-L1 ELISA Kit – 9-N-ab214565), para tal procedimiento a cada uno de los pozos de los microplatos que vienen en el kit se les agrega 100 µL de la muestra problema o 100 µL de las soluciones patrón las cuales son concentraciones conocidas de la proteína PD-L1 en un rango desde 0,16 – 10 ng/mL. El microplato se dejó incubando durante 80 minutos a 37 °C. Posteriormente, se descarta el líquido y se lava 3 veces con 200 µL de buffer de lavado. Luego se agregó 100 µL del anticuerpo de detección el cual está conjugado con biotina, se deja incubando 50 minutos a 37 °C. Una vez pasado este tiempo se descarta el líquido y se vuelve a lavar 3 veces, para luego adicionar 100 µL de estreptavidina conjugada a HRP y se deja incubando nuevamente durante 50 minutos a 37 °C, luego se lava nuevamente 3 veces para finalmente adicionar 90 µL de la solución sustrato con TMB y se incuban durante 20 minutos en oscuridad a 37 °C. Luego de este tiempo de incubación se agrega rápidamente 50 µL de buffer de parada, se mezcla durante 1 minuto y se mide la absorbancia a 450 nm, para

calcular los resultados de la concentración en las muestras problema dependiendo de la curva de calibración (Figura 6-4).

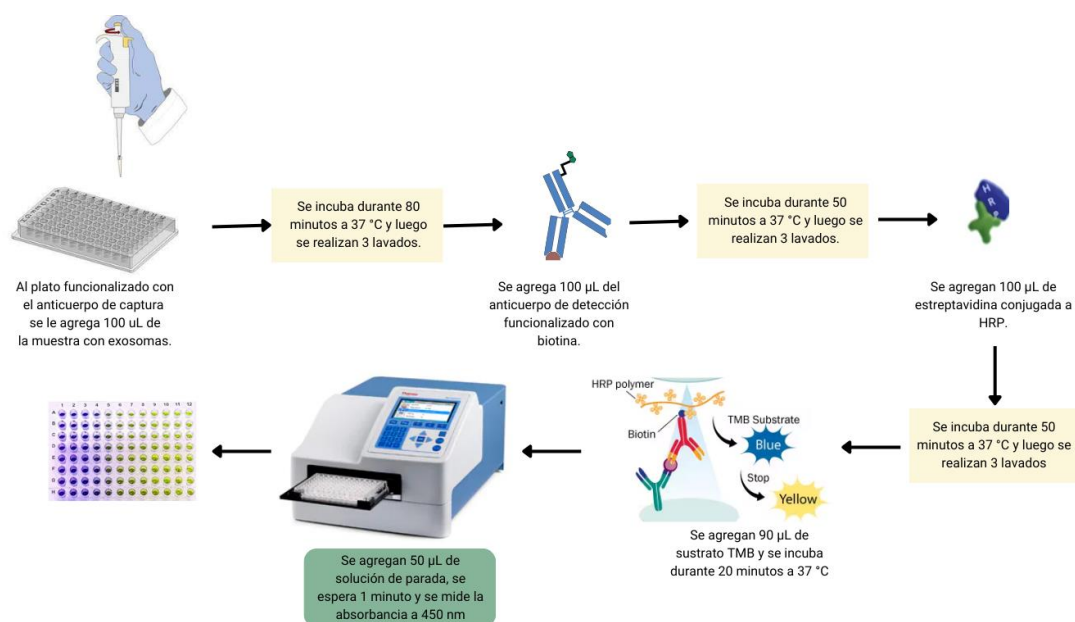


Figura 6-4. Metodología de ELISA para la cuantificación de PD-L1.

6.8. Análisis estadístico

Los datos fueron representados como promedio de la variable respuesta. Los datos fueron evaluados para los supuestos de normalidad (distribución de datos y homogeneidad de varianzas), seguido de un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias (prueba Tukey).

Para todos los análisis se tuvo en cuenta un nivel de significancia de $p < 0.05$, con el programa Statistica 10.0.

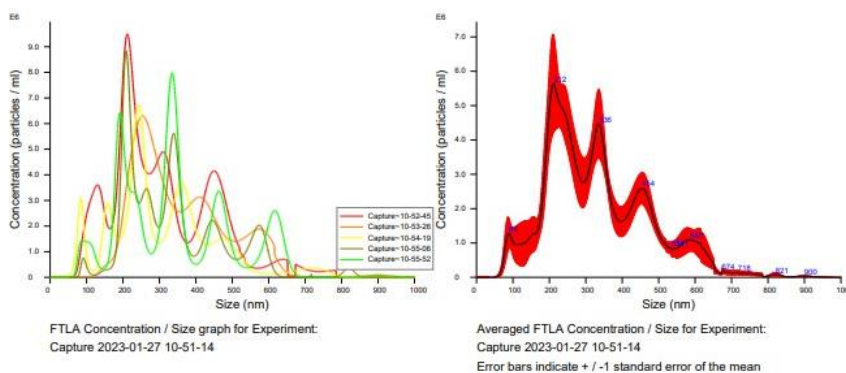
7. Resultados y Discusión

En este trabajo se planteó la necesidad de detectar un biomarcador tumoral (PD-L1), expresado en los exosomas obtenidos de suero y orina de pacientes con cáncer avanzado estadio IV quienes habían expresado previamente en biopsias primarias tumorales un nivel de PD-L1 mayor del 10% , para lo cual se inició el estudio desde la estandarización de la expresión de la proteína exosomal en cultivo de células tumorales de una línea de cáncer de pulmón A549 y posteriormente la determinación de la proteína PD-L1 exosomal en biopsias líquidas de sangre y orina de pacientes con cáncer avanzado.

7.1. Caracterización de exosomas provenientes de líneas celulares de cáncer de pulmón.

Para la caracterización morfológica y bioquímica de los exosomas obtenidos de cultivos de células tumorales de cáncer de pulmón A549, los exosomas fueron purificados a través de dos técnicas de separación, por columna de afinidad, la cual contiene un ligando específico para los exosomas, mientras que la segunda técnica ultrafiltración, permite una separación de las vesículas extracelulares por tamaño. Las microvesículas y exosomas purificados por las técnicas mencionadas anteriormente, fueron sometidas a un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, *Nanoparticle Tracking Analysis*) (Figuras 7-1 y 7-2)

En los análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) las vesículas extracelulares del medio de cultivo de las células tumorales de cáncer de pulmón, purificadas por ultrafiltración (Figura 7-1), con una concentración de $3,42 \cdot 10^9$ partículas/mL. Se pueden observar diferentes picos de diámetros de estructuras, entre los cuales los primeros picos (80 - 212 nm) corresponden a los tamaños esperados de exosomas, sin embargo, se encuentran estructuras de mayor tamaño que podrían clasificar dentro de microvesículas o fusión de exosomas. Lo anterior se validó al realizar la purificación por columna de afinidad, la cual es específica para un marcador de membrana exosomal, lo que garantiza la obtención de población pura de exosomas, y fueron sometidos posteriormente a un análisis por NTA (Figura 7-2), con una concentración de $3,29 \cdot 10^9$ partículas/mL, en donde se observan exosomas con diámetros entre 100 y 200 nm, pero adicional se observan estructuras de exosomas de mayor diámetro 330 y 520 nm, lo que valida la fusión de exosomas.



| Included Files | Results |
|-----------------------------|--------------------|
| Capture 2023-01-27 10-52-45 | Stats: Merged Data |
| Capture 2023-01-27 10-53-26 | Mean: 329.9 nm |
| Capture 2023-01-27 10-54-19 | Mode: 211.0 nm |
| Capture 2023-01-27 10-55-06 | SD: 141.1 nm |
| Capture 2023-01-27 10-55-52 | D10: 181.6 nm |

Figura 7-1. Caracterización por NTA de exosomas tumorales de cáncer de pulmón, purificados mediante ultrafiltración. Eje Y, Concentración de partículas (vesículas extracelulares), eje X diámetro de microvesículas.

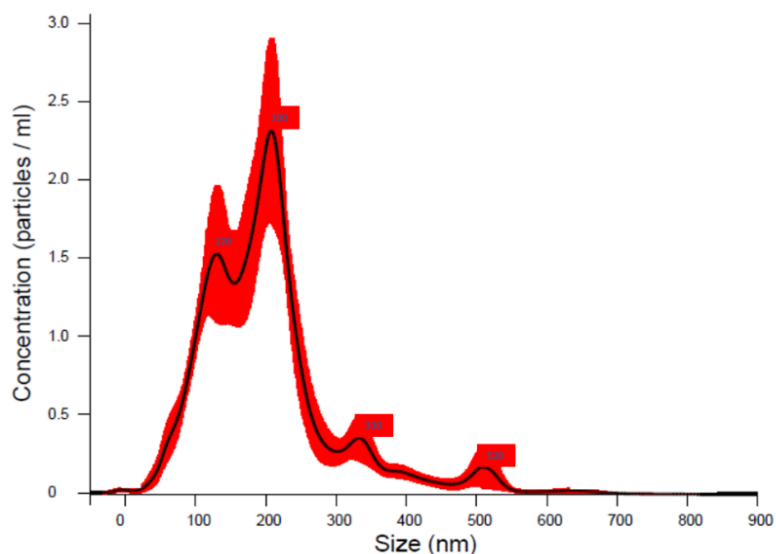


Figura 7-2. Caracterización por NTA de exosomas tumorales de cáncer de pulmón, purificados mediante columna de afinidad. Eje Y, Concentración de partículas (microvesículas), eje X diámetro de microvesículas.

Con base en los análisis cuantitativos obtenidos por NTA, se realizaron dos curvas de cuantificación. En la primera curva se determinó la relación de proteína exosomal mediante la técnica de Bradford, con el número de exosomas (Figura 7-3), la proteína utilizada para la curva estándar fue albúmina de suero bovino. Esta relación es necesaria en la parte clínica debido a que las unidades de aplicación *in vivo*, preclínica o clínica, se toma como dato microgramos de proteína exosomal, por lo que era fundamental determinar el componente proteico por exosomal. El resultado de la cuantificación se encuentra en la

tabla 7-1. En la segunda curva se determinó la presencia de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (Tabla 7-1), como un marcador bioquímico exosomal de la vía endocítica, encontrando una relación entre la actividad enzimática y el número de exosomas (Figura 7-4). Estos resultados permiten tener un control de la pureza de los exosomas y posibles contaminantes proteicos que están presentes en las muestras de cultivo, como las lipoproteínas o agregados grandes de proteínas, que por el tamaño pueden ser contaminantes en las separaciones por columna de afinidad, pero aún más en la técnica de ultrafiltración, además al agregarse, pueden formar estructuras de un tamaño similar a las vesículas extracelulares y ser detectadas por el NTA.

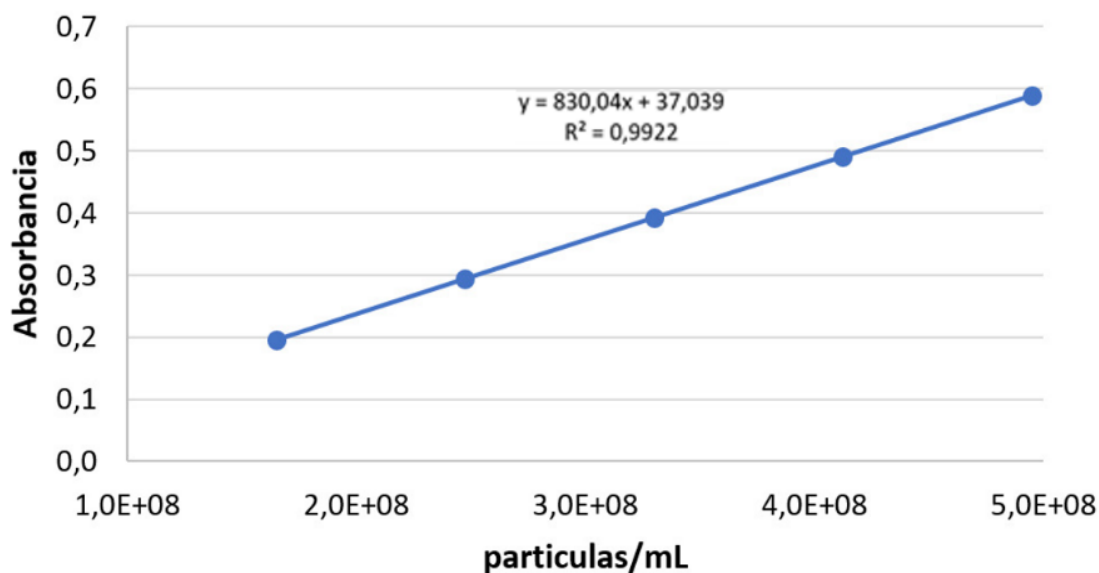


Figura 7-3. Cuantificación de proteína exosomal mediante la técnica de Bradford. Eje X, concentración de exosomas (partículas) determinada por análisis NTA. Eje Y, Variación de la absorbancia producida por el cambio de color del azul brillante de Coomassie presente en el reactivo de Bradford cuando se intercala en la estructura proteica.

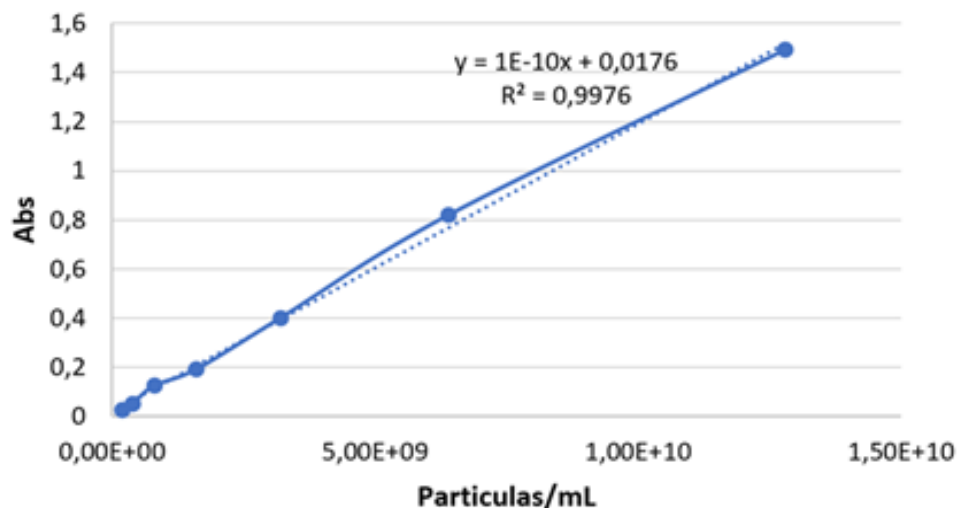


Figura 7-4. Cuantificación de la actividad enzimática Acetilcolinesterasa como biomarcador exosomal.

Tabla 7-1. Resultados de aislamiento y cuantificación de exosomas

| Parámetro | Valor |
|---|---------------------------------|
| Numero de células obtenidas | 1000000 células |
| Células por volumen | 200000 células/mL |
| Cantidad cargada en columna | 5 mL |
| Concentración de exosomas por columna | $3,29 \cdot 10^9$ partículas/mL |
| Concentración de exosomas por ultrafiltración | $1,42 \cdot 10^9$ partículas/mL |
| Rendimiento de exosomas totales | $1,64 \cdot 10^{10}$ partículas |
| Rendimiento de exosomas por célula | 16000 partículas/célula |
| Concentración de exosomas por proteína | 2,12 mg/mL |
| Concentración de exosomas por AChE | 13,50 mU/mL |

Por último, se realizaron análisis morfológicos de los exosomas mediante las técnicas de microscopía electrónica de transmisión (*Transmission electron microscopy*, TEM) (Figura 7-5), donde se pudo observar un diámetro de 100 nm aproximadamente y se puede verificar presencia de la bicapa lipídica que recubre la esfera y la morfología circular esperada. Además, por la técnica de dispersión de luz dinámica (*Dynamic Light Scattering*, DLS) (Figura 7-6), en donde se registró el tamaño promedio de los exosomas, cercano a los 80 nm, es importante mencionar que esta metodología no permite verificar la presencia de partículas de gran tamaño, como se alcanza a observar en la técnica NTA, pues el DLS esta

optimizado para hacer mediciones correctas cuando la muestras monodispersas y puede presentar errores en muestras polidispersas por las limitaciones técnicas del equipo, sin embargo complementa los resultados obtenidos por NTA para determinar las poblaciones más predominantes en la muestra.

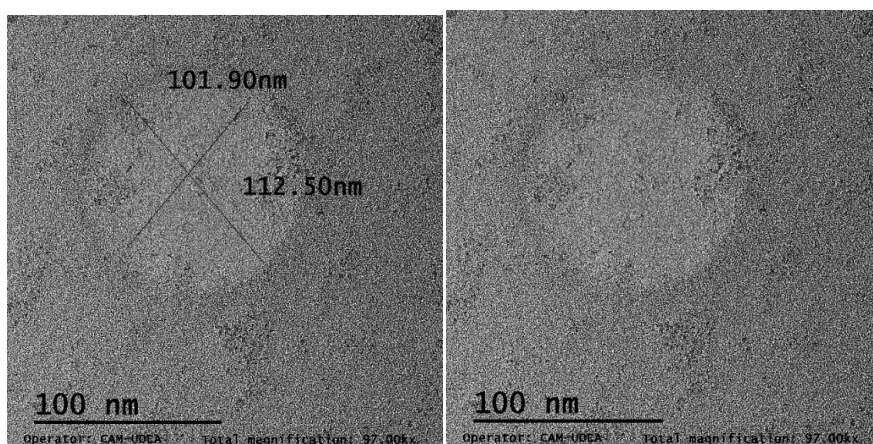


Figura 7-5. Caracterización de exosomas tumorales de cáncer de pulmón, por microscopía electrónica de transmisión (TEM), la barra ilustra el orden de un tamaño de 100nm

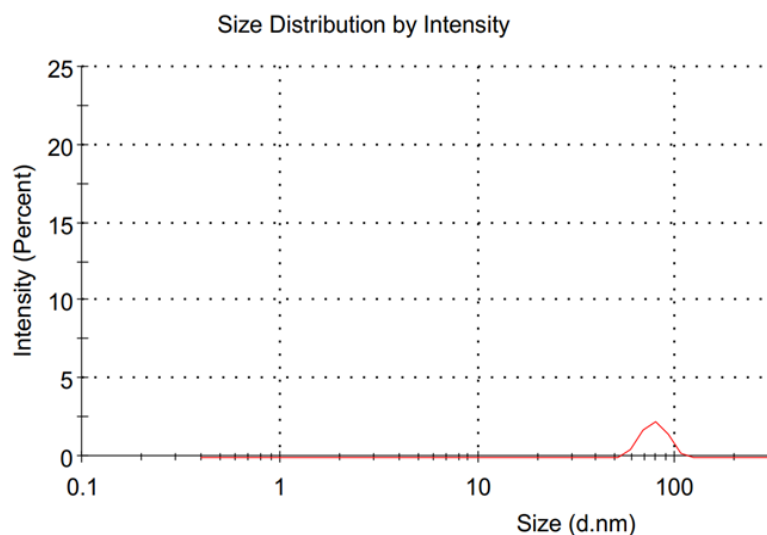


Figura 7-6. Caracterización de exosomas tumorales de cáncer de pulmón, mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS).

7.2. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble en muestras derivadas de cultivo celular de A549

Para determinar los niveles de la proteína Ligando 1 de muerte programada (PD-L1), asociada a los exosomas o libre (soluble), las células de cáncer de pulmón fueron cultivadas en ausencia de suero por 48 horas, y el medio de cultivo fue recolectado y sometido a ultrafiltración, en donde se obtienen dos componentes, las microvesículas retenidas y el filtrado. En ambos componentes se determinó la cantidad de PD-L1 exosomal y el soluble (filtrado) mediante la técnica de ELISA. Las muestras fueron realizadas por triplicado (Tabla 7-2), y analizadas para los supuestos de normalidad (distribución datos y homogeneidad de varianzas (Tabla 7-3), seguido de un análisis de varianza (Tabla 7-4), y de una prueba de comparación de medias entre los grupos experimentales (Tabla 7-5).

Para los niveles basales de expresión de PD-L1 en exosomas, se seleccionaron las células madre mesenquimales de cordón umbilical (MSC), las cuales tienen propiedades proliferativas (no tumorales) y presentan expresión de PD-L1 (Xu et al, 2022).

El nivel de PD-L1 en el medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón (A549), fue mayor en exosomas (189,53 ng/ml), mientras que el soluble fue de 10,17 ng/ml (Tabla 7-2). Adicionalmente se determinaron los niveles de PD-L1 en células proliferativas no tumorales, células madre mesenquimales de cordón umbilical (MSC), las cuales expresan PD-L1 (Xu et al., 2022). La expresión de PD-L1 en MSC fue de 16,74 ng/ml en exosomas y en la fracción soluble de 22,52 ng/ml.

Tabla 7-2. Parámetros estadísticos. Niveles (ng/ml) de PD-L1 exosomal y soluble en medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón.

| | Valid N | Mean | Std.Dev. | Standard - Error |
|---------------------|---------|--------|----------|------------------|
| A549 Soluble | 3 | 10,17 | 2,50 | 1,44 |
| A549 EXO | 3 | 189,53 | 0,82 | 0,47 |
| MSC Soluble | 3 | 22,52 | 8,18 | 4,72 |
| MSC EXO | 3 | 16,74 | 15,91 | 9,19 |

Los datos obtenidos de la cuantificación de PD-L1, fueron evaluados para los supuestos de normalidad, como distribución de datos y homogeneidad de varianzas (Tabla 7-3) en los cuales se encontró un valor de $p > 0,05$, indicando que los parámetros evaluados cumplen con la distribución normal de los datos.

Tabla 7-3. Prueba de Homogeneidad de Varianzas (supuesto de Normalidad). Niveles de PD-L1 exosomal y soluble en medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón.

| Brown-Forsythe Test of Homog. of Variances (PD-L1 mg proteína. Marked effects are significant at $p < ,05000$ | | | | | | | | |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------|----------|
| | SS - Effect | df - Effect | MS - Effect | SS - Error | df - Error | MS - Error | F | p |
| ng PD-L1 / mg Prot | 182,58 | 3 | 60,86 | 257,99 | 8 | 32,24 | 1,89 | 0,21 |

Al cumplir con los supuestos de normalidad, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (Tabla 7-4), encontrando una $p < 0,05$, indicando un efecto sobre la variable cantidad de PD-L1, y posteriormente, se realizó una prueba de comparación de medias, entre los grupos de estudio, descritos en la tabla 7-2. Al realizar el análisis con la prueba de Tukey (Tabla 7-5), se encontraron los niveles más altos de PD-L1 en exosomas de las células tumorales de pulmón (A549), estos valores fueron significativamente ($p < 0,05$, Tabla 7-5) más altos que los encontrados en la forma soluble de las células tumorales y de los niveles detectados para las células madre mesenquimales (MSC) (Tabla 7-2). Los niveles de PD-L1 en las células madre mesenquimales encontrados en exosomas y forma soluble (Tabla 7-2), no presentaron diferencia significativa (Figura 7-7).

Tabla 7-4. Análisis de Varianza. Niveles de PD-L1 exosomal y soluble en medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón (A549) y células madre mesenquimales de cordón umbilical (MSC).

| Analysis of Variance (PD-L1 mg proteína) Marked effects are significant at $p < ,05000$ | | | | | | | | |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|----------|----------|
| | SS - Effect | df - Effect | MS - Effect | SS - Error | df - Error | MS - Error | F | p |
| ng PD-L1 mg Prot | 67612,48 | 3 | 22537,49 | 654,05 | 8 | 81,76 | 275,67 | 0,0000 |

Tabla 7-5. Comparación de medias por el test de Tukey. Niveles de PD-L1 exosomal y soluble en medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón (A549) y células madre mesenquimales de cordón umbilical (MSC).

Tukey HSD test; Variable: ng PD-L1 mg Prot. Marked differences are significant at p < ,05000

| | A549 Soluble | A549 EXO | MSC Soluble | MSC EXO |
|---------------------|---------------------|-----------------|--------------------|----------------|
| A549 Soluble | | 0,000231 | 0,395729 | 0,810659 |
| A549 EXO | 0,000231 | | 0,000231 | 0,000231 |
| MSC Soluble | 0,395729 | 0,000231 | | 0,860265 |
| MSC EXO | 0,810659 | 0,000231 | 0,860265 | |

Con base en los análisis anteriores, los niveles más altos de PD-L1 fueron encontrados en los exosomas retenidos en el filtro (Figura 7-7). Estos niveles presentan diferencia significativa con los niveles solubles. Adicionalmente, los niveles de PD-L1 exosomal y soluble en las células madre mesenquimales fueron menores que los niveles encontrados en los exosomas de las células tumorales. Por lo tanto, los exosomas provenientes de líneas tumorales tiene un gran nivel de expresión de la proteína PD-L1 en su superficie, más de 8 veces la que tienen los exosomas derivados de la línea de control. Otro aspecto importante es que en el medio condicionado los niveles de PD-L1 soluble son bajos y la mayoría de la PD-L1 será encontrada asociada a la membrana celular, que en este caso hace parte de los exosomas. Con estos resultado se confirma que hay unos niveles basales de proteína PD-L1 libre en el medio, que es similar entre líneas celulares que tienen la capacidad de expresar PD-L1, pero en cuanto a la PD-L1 asociada a vesículas extracelulares hay un aumento notable en la cantidad de PD-L1 cuantificada en las células que teóricamente expresan mayor cantidad de la proteína y al ser una proteína ubicada en la membrana externa tiene sentido que se encuentre una mayor proporción las vesículas extracelulares producidas.

Con estos resultados se confirma que hay unos niveles basales de proteína PD-L1 libre en el medio, que es similar entre líneas celulares que tienen la capacidad de expresar PD-L1, pero en cuanto a la PD-L1 asociada a vesículas extracelulares hay un aumento notable en la cantidad de PD-L1 cuantificada en las células, que teóricamente expresan mayor cantidad de la proteína.

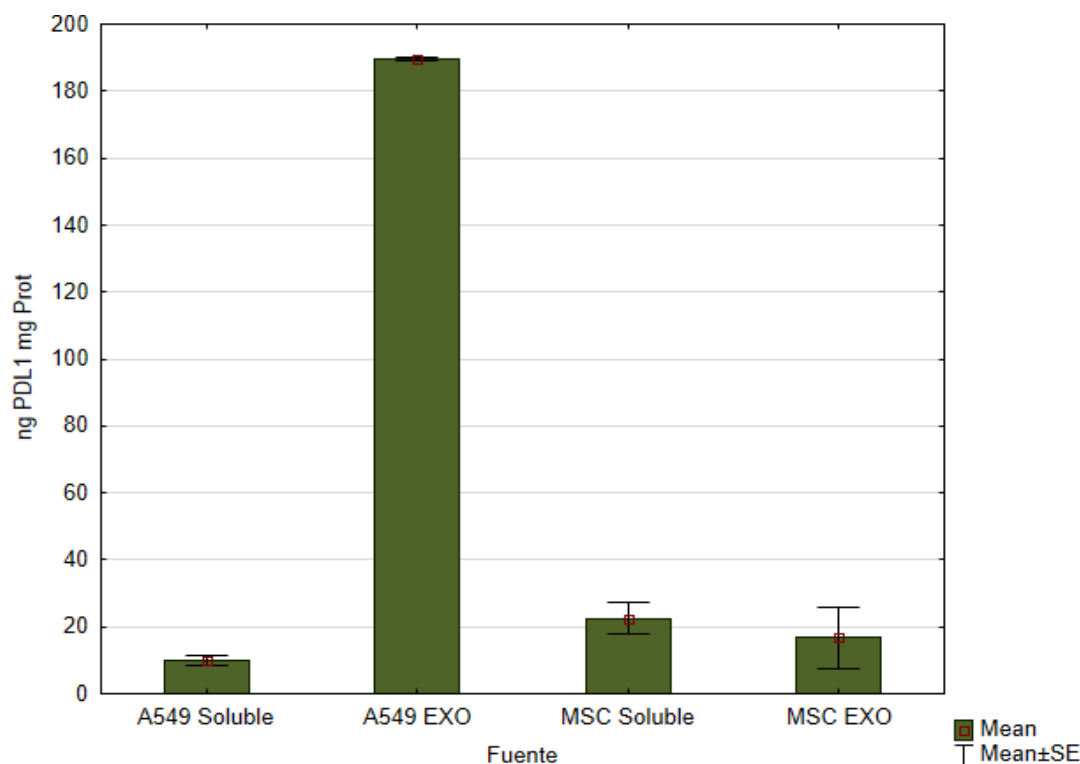


Figura 7-7. Niveles de PD-L1 exosomal y soluble en medio de cultivo de células tumorales de cáncer de pulmón. Descripción de siglas en el texto.

Adicionalmente se implementó la evaluación funcional de los exosomas obtenidos de las células tumorales, para lo cual se eligió su efecto inmunomodulador (Di Tinco et al., 2021), a través de su reconocida función inhibidora sobre la proliferación de los linfocitos previamente estimulados. Este efecto de los exosomas tumorales fue determinado sobre la proliferación de linfocitos activados previamente con fitohemaglutinina al 1% (PHA) por 3 días de cultivo. Al día 3, al cultivo de linfocitos fueron adicionados los exosomas (4×10^8 exosomas totales) (Tabla 7-6), encontrando una inhibición de proliferación del 67.16% al compararlo con el control de proliferación de linfocitos en ausencia de exosomas (Figura 7-8). Sin embargo, el efecto inmunomodulador del exosoma, no se puede atribuir solamente a la expresión de PD-L1, debido a que existen otros mecanismos (Kugeratski and Kalluri, 2020). Pero se puede al menos inferir que la proteína PD-L1 asociada a exosomas y que se ha confirmado por el método de ELISA anterior tiene un efecto directo en la actividad de los linfocitos y cumplen un rol en la comunicación intracelular.

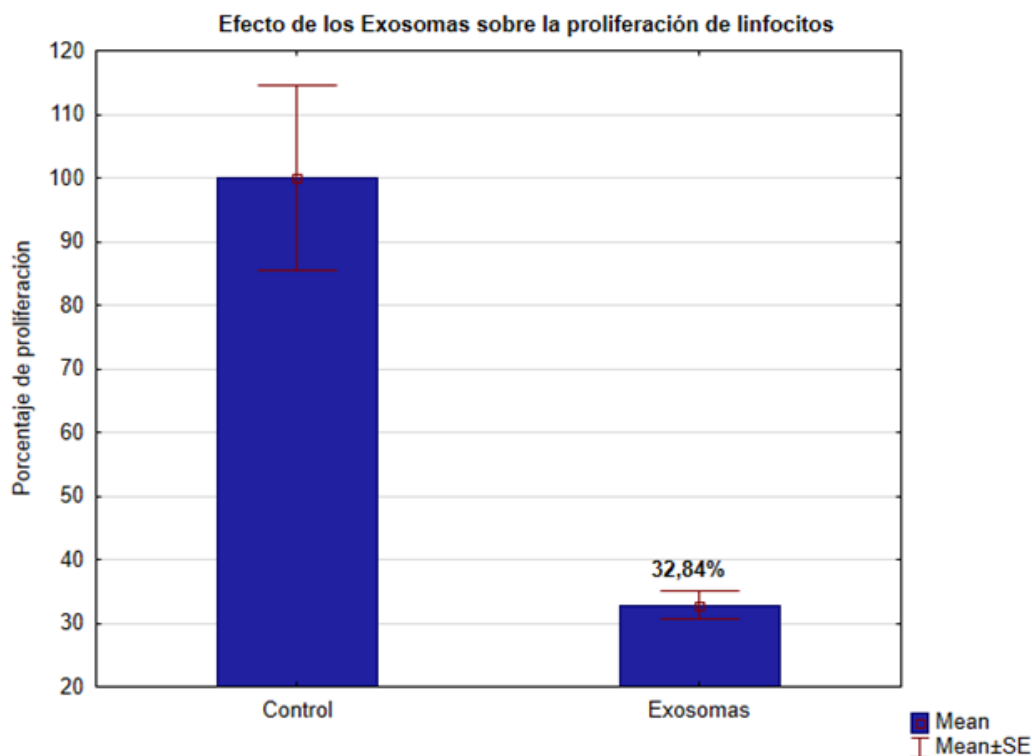


Figura 7-8. Efecto inmunomodulador de los exosomas. Los exosomas tumorales presentan un efecto inhibitor sobre la proliferación de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA). Los exosomas (4×10^8 exosomas) fueron adicionados a los 3 días de proliferación y su evaluación se realizó tres días después de la adición de los exosomas.

Tabla 7-6. Resultados del efecto inmunomodulador de los exosomas

| | Mean Control | Mean Exosomas | t-value | df | p |
|-------------------|--------------|---------------|---------|----|--------------|
| Linfocitos | 5.886.667 | 1.933.333 | 4,58 | 4 | 0,010 |

7.3. Cuantificación de PD-L1 exosomal y soluble en muestras derivadas de pacientes con Cáncer

Para determinar los niveles de PD-L1 exosomal y soluble en biopsias líquidas de 4 pacientes con neoplasias avanzadas, con la aprobación del comité ético certificado de IPS (institución prestadora de salud) Clínica de Occidente perteneciente a la empresa Quiron Salud y previo consentimiento informado, las muestras de los 4 pacientes fueron recolectadas. Inicialmente se evaluó el método de obtención de exosomas de plasma por ultrafiltración comparado con el método estándar de columna de afinidad en 1 paciente (Tabla 7-7), adicionalmente se evaluó la biopsia líquida de orina por el método de ultrafiltración.

Tabla 7-7. Parámetros estadísticos. Niveles (ng/ml) de PD-L1 exosomal en plasma y orina de paciente numero 1 con neoplasia avanzada.

| Método de Purificación | Biopsia Líquida | n | Mean | Std.Dev. | Standard Error |
|-------------------------------|------------------------|----------|-------------|-----------------|-----------------------|
| UltraFiltración | Plasma | 3 | 46,79 | 2,67 | 1,54 |
| Columna Afinidad | Plasma | 3 | 65,73 | 2,10 | 1,21 |
| UltraFiltración | Orina | 3 | 12,48 | 2,22 | 1,28 |

Al comparar los niveles de PD-L1 exosomal en las biopsias líquidas, por los diferentes métodos de purificación, se encontró un efecto significativo al comparar los niveles de PD-L1 asociado a las vesículas extracelulares (Tabla 7-8), siendo entonces el mejor método de separación la purificación por columna de afinidad (Figura 7-9). La columna tiene la ventaja de concentrar aún más la cantidad de exosomas que se están evaluando, aparte de eliminar las impurezas como agregados de proteínas que muchas veces no son filtrados completamente en el método de ultrafiltración y que podrían interferir con la medición de la PD-L1. Pero el método de ultrafiltración, aunque con posibles impurezas, tiene una recuperación de exosomas que sigue siendo comparablemente alta y al ser mucho más económico que el método de columna de afinidad es de mayor practicidad para su uso cuando se tiene varias muestras a la vez. Por tal motivo se selecciona el método de ultrafiltración para hacer la comparación entre pacientes en los ensayos posteriores.

Además, se encontró que la biopsia líquida de plasma presenta mayores niveles de PD-L1 exosomal, que los obtenidos en orina (Figura 7-9). Una explicación a este factor es que muchas de las vesículas presentes en la sangre son filtradas por parte de los riñones antes de que pasen a la orina con lo cual disminuye la concentración, pero aún se encuentran niveles de expresión de PD-L1 que son comprables entre los grupos de estudios.

Tabla 7-8. Comparación de medias por el test de Tukey. Niveles (ng/ml) de PD-L1 exosomal en plasma y orina de paciente con neoplasia avanzada. $p < 0.005$, presentan diferencias estadísticamente significativas.

| Método Purificación | {1} | {2} | {3} |
|----------------------------|------------|------------|------------|
| Plasma Ultrafiltración | | 0,000356 | 0,000227 |
| Plasma Columna de afinidad | 0,000356 | | 0,000227 |
| Orina Ultrafiltración | 0,000227 | 0,000227 | |

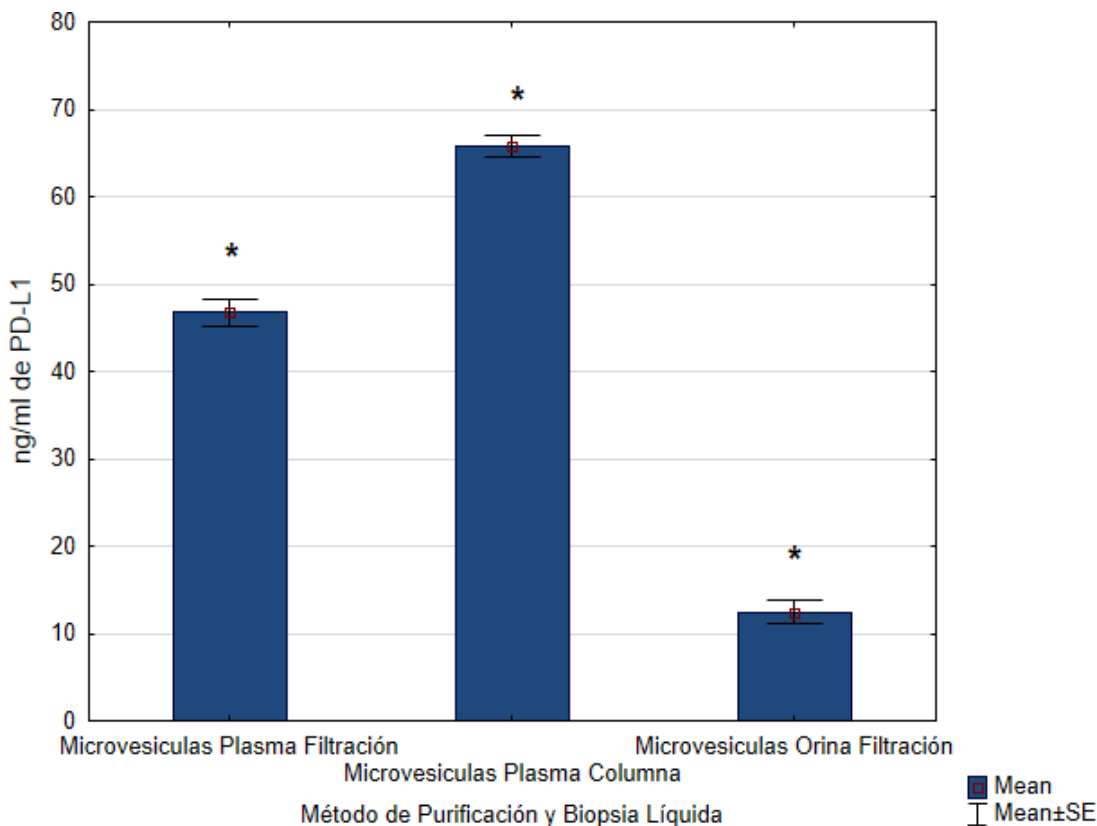


Figura 7-9. Niveles de PD-L1 exosomal en biopsias líquidas de pacientes con neoplasias avanzadas purificadas por columna de afinidad o ultrafiltración. La determinación de PD-L1 se realizó en la fracción vesicular (exosomas). Todos los grupos presentan diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Con base en lo anterior, se analizaron las muestras plasma (de sangre periférica) y orina (Tablas 7-9 a 7-12) de pacientes con neoplasias avanzadas, utilizando el método de ultrafiltración para la separación de las vesículas extracelulares. Al analizar los niveles de PD-L1, se encontró que los niveles de PD-L1 exosomal en plasma, son significativamente más altos que los niveles exosomales en orina, y que los niveles solubles en plasma en todos los pacientes evaluados (Figura 7-9). A pesar de la expresión del biomarcador de PD-L1 exosomal en orina, se ha discutido su uso en diagnóstico y seguimiento, debido a la alta variabilidad y límite en su reproducibilidad; como es el factor del momento de recolección, en donde la primera orina de la mañana generalmente es más concentrada que la toma de orina de una forma aleatoria durante el día, lo cual podría generar una mayor concentración de microvesículas. Adicionalmente, el tiempo de recolección podría afectar la estabilidad de los exosomas, debido a que la recolección por 24 podría generar una acelerada degradación. Otro factor importante es el efecto de enfermedades crónicas, como la

enfermedad renal, la cual puede afectar los niveles de exosomas en las biopsias líquidas (orina) (Erdbrügger et al., 2020).

Tabla 7-9. Paciente 1. MYR Paciente de 59 años con Dx Carcinoma de cuello uterino estadio Inicial IIB en 2020 recibió Quimio y radioterapia concomitante, no asistió a controles, en Julio de 2022 Pet Ct con lesión tumoral expansiva en cuerpo de útero y cuello uterino, adenopatías retroperitoneales DX Carcinoma de cuello uterino estadio IV, inicia quimioterapia en base a Carboplatino, paclitaxel y Bevacizumab por 6 ciclos con Pet ct de revaloración en Abril de 2023 con hallazgos de respuesta metabólica completa actualmente en tratamiento con Bevacizumab y ciclofosfamida PD-L1 DEL 10% sin tratamiento de inmunoterapia.

| Paciente 1 | Valid N | Mean | Std.Dev. | Std.Error |
|-----------------------|---------|--------------------|----------|-----------|
| Microvesículas Plasma | 3 | 46,79 ^a | 2,67 | 1,54 |
| Soluble Plasma | 3 | 21,61 ^b | 1,77 | 1,02 |
| Microvesículas Orina | 3 | 12,48 ^c | 2,22 | 1,28 |
| Soluble Orina | 3 | 14,54 ^d | 2,20 | 1,27 |

Tabla 7-10. Paciente 2. AB- Paciente masculino de 30 años Dx Carcinoma escamocelular del cavum Faringeo derecho, pobremente diferenciado, Tumor Irresecable, Estadio IV, por compromiso pulmonar en 2020 Quimioterapia inicial 5Fu Cisplatino, persistencia de enfermedad ganglionar cervical es llevado a vaciamiento cervical, en quimioterapia actual paliativa en base a Gemcitabina y cisplatino, reporte de Junio 2023 PD-L1 del 40%, Pet ct de marzo 2023, incremento de tamaño de nódulos pulmonares y en pleura, hueso, compromiso mediastinal y hepático, pendiente inicio de inmunoterapia.

| Paciente 2 | Valid N | Mean | Std.Dev. | Std.Error |
|-----------------|---------|--------------------|----------|-----------|
| Retenido Plasma | 3 | 42,57 ^a | 7,26 | 40,99 |
| Soluble Plasma | 3 | 18,19 ^b | 0,69 | 17,62 |
| Retenido Orina | 3 | 27,96 ^c | 0,55 | 27,68 |
| Soluble Orina | 3 | 11,97 ^d | 1,71 | 9,92 |

Tabla 7-11. Paciente 3. MC Paciente Femenina de 61 años Dx Carcinoma Urotelial de Vejiga Estadio IV quimioterapia Neoadyuvante con respuesta parcial, cistectomía radical, derivación urinaria, ECOG 1-2 compromiso metastásico a pared abdominal y peritoneo por PET /CT PD-L1 Desconocido, inicia Inmunoterapia monoagente con Pembrolizumab aprobado por guías internacionales e Invima para este tipo de patologías independiente de PD L1 (no es necesario realizarlo de rutina)

| Poniente 3 | Valid N | Mean | Std.Dev. | Std.Error |
|------------------------|----------------|--------------------|-----------------|------------------|
| Retenido Plasma | 3 | 41,96 ^a | 1,13 | 40,35 |
| Soluble Plasma | 3 | 7,06 ^b | 0,04 | 8,28 |
| Retenido Orina | 3 | 25,08 ^c | 1,20 | 24,63 |
| Soluble Orina | 3 | 10,57 ^d | 0,33 | 10,32 |

Tabla 7-10. Paciente 4. AV Paciente Femenina de 62 años con DX Colangiocarcinoma Estadio IV, compromiso Hepático y ganglionar, recibió quimioterapia neoadyuvante con Gemcitabina y Capecitabina con reducción de un 60% del tumor, fue llevada a Hepatectomía parcial en enero de 2023 con reporte de tumor de 4 cms sin muestreo ganglionar aun sin reporte de PD-L1 (no hay indicación aún en el país de indicación Invima del uso de anti-PD-L1 para este tipo de patologías. Evidencia en mayo de 2023 nueva progresión ganglionar en hilio hepático y retroperitoneal. Actualmente en quimioterapia de segunda línea

| Paciente 4 | Valid N | Mean | Std.Dev. | Std.Error |
|------------------------|----------------|--------------------|-----------------|------------------|
| Retenido Plasma | 3 | 27,18 ^a | 3,87 | 2,24 |
| Soluble Plasma | 3 | 8,74 ^b | 0,51 | 0,30 |
| Retenido Orina | 3 | 12,69 ^c | 0,51 | 0,29 |
| Soluble Orina | 3 | 7,12 ^d | 0,63 | 0,36 |

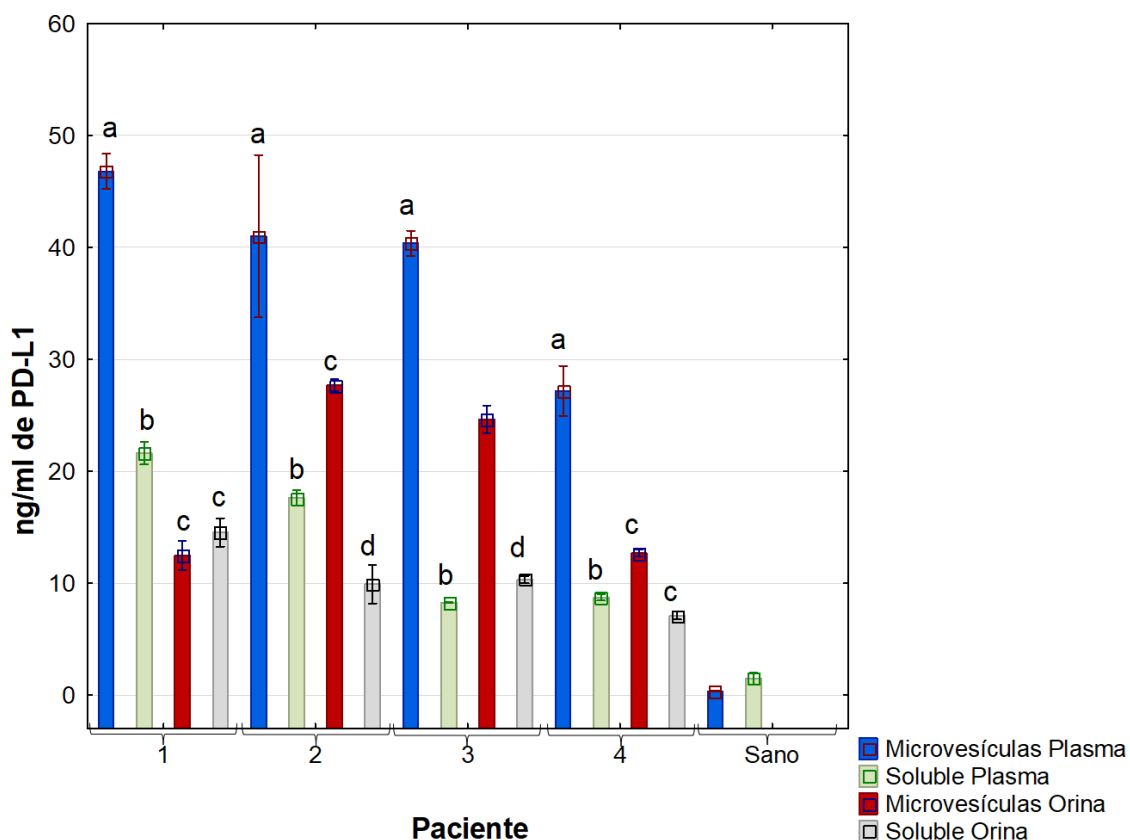


Figura 7-10. Niveles de PD-L1 exosomal y soluble en biopsias líquidas de pacientes con neoplasias avanzadas. Las biopsias líquidas fueron purificadas por ultrafiltración. Exosomas Plasma (azul – Retenido), Exosomas Orina (rojo – Retenido), filtrado o soluble (verde o gris). Las mediciones fueron realizadas por triplicado en cada paciente. Letras diferentes en cada paciente, representan diferencia estadística significativa $p < 0,005$.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la presencia del biomarcador PD-L1 en exosomas tumorales, obtenidos de líneas celulares, como también en biopsias líquidas de pacientes con cáncer avanzado. Los niveles de este biomarcador exosomal en plasma, presenta diferencia significativa con los niveles encontrados en tanto en exosomas de orina, como con la forma soluble (no asociado a exosomas) de plasma y orina. Y además se observa una gran diferencia cuando se compara a los pacientes sanos ($p < 0,005$) los cuales la expresión de PD-L1 en expresión es muy bajas y no es detectable en su forma soluble. Con lo cual la medición de PD-L1 en los exosomas tiene un potencial para dar información complementaria acerca del tumor.

Los niveles de PD-L1 exosomal en los pacientes 1 y 2 se correlacionan con la expresión de PD-L1 en biopsia, siendo para el paciente 1 expresión del 10% y del paciente 2 del 40%, lo cual podría ser de utilidad en el seguimiento del tratamiento cuando se instaure, ambos

pacientes son fuertes candidatos a inicio de Inmunoterapia.

La paciente 1 con Dx Carcinoma de cuello uterino tiene Pet Ct de Abril 2023 que evidencia ausencia de enfermedad macroscópica, pero ante la evidencia de elevación del Biomarcador PD-L1 exosomal sérico, obliga a realización de nuevo Pet Ct es probable que en poco tiempo la enfermedad recurra e inicie tratamiento con el monoclonal, es muy interesante este hallazgo puesto que se está detectando enfermedad residual que las imágenes de Pet ct no están detectando, este hallazgo no está descrito en la literatura médica actual lo cual corrobora aún más la importancia de este Biomarcador en el seguimiento de los pacientes y las próximas mediciones de PD-L1 exosomal serán fundamentales en la toma de decisiones

El paciente 2 con Dx Carcinoma Nasofaringe con expresión de PD-L1 del 40 % por Inmunohistoquímica, con niveles elevados séricos, probablemente inicie el tratamiento en las próximas semanas, vale aclarar que dicho paciente al momento de la toma de la muestra no había dato disponible del PD-L1 por inmunohistoquímica , siendo esta correlación concordante importante no solo en el seguimiento y efectividad terapéutica , sino también en los casos de posibles errores en el procesamiento de las muestras de patología para el marcador de PD-L1 en inmunohistoquímica que podrían limitar el uso del manejo terapéutico específico ante hallazgos menores del 1% donde los patólogos y las plataformas que usan podrían dar datos erróneos en este marcador por inmunohistoquímica (Girolami I, 2021) y privar al paciente de tratamientos oncoespecíficos.

En el paciente 3 cuyos niveles de PD-L1 desconocemos por cuestiones de logística y autorización de la prueba que se escapa del estudio también existe evidencia de elevación del marcador exosomal tanto en suero y orina, este paciente con cáncer de Vejiga estadio IV en segunda línea la FDA y EMA aprueban el uso de los inhibidores del punto de control sin la realización de la prueba de Inmunohistoquímica PD-L1 (Eckstein M 2019), así como en nuestro país está aprobado para esta indicación en segunda línea sin la necesidad de la realización de la prueba de inmunohistoquímica, pero como en otros tumores que expresan dicho marcador el seguimiento se realiza solo por clínica y por imágenes, definiendo resistencia al tratamiento en la mayoría de los casos ya en situaciones clínicas

donde el paciente se ha deteriorado y es muy difícil iniciar un nuevo tratamiento y además el recurso económico desperdiciado siendo estos tratamientos en estas circunstancias poco costo efectivo (Aguar P 2018).

El Paciente 4 sin poder realizar PD-L1 en Inmunohistoquímica muestra niveles séricos exosomales fue el menor, lo cual probablemente se relacione con nivel de expresión bajo, aunque existe literatura en la cual la inmunohistoquímica para PD-L1 no siempre se correlaciona con los niveles séricos exosomales (Li,C 2019)

Los datos expuestos anteriormente nos dan las bases científicas para continuar desarrollando este biomarcador exosomal en los diferentes escenarios clínicos en los cuales existe una gran deficiencia en el seguimiento y detección temprano de fallas terapéuticas en base a la inmunoterapia basada en los bloqueadores del punto de control en los diferentes tipos de neoplasias que expresan el marcador por inmunohistoquímica. De esta manera se plantea la posibilidad de utilizar la detección de PD-L1 exosomal en plasma de pacientes con neoplasias avanzadas que expresan en la biopsia dicho marcador, como un método rápido, económico y costo efectivo, que podría ser utilizado para correlacionar los hallazgos de las biopsias y la muestra sérica y para el seguimiento de los pacientes y de la efectividad o no de los tratamientos.

8. Conclusiones

Los resultados indican que la expresión de PD-L1 asociada a vesículas extracelulares, especialmente en exosomas, es considerablemente más elevada en pacientes con cáncer en comparación con los voluntarios sanos. Esto sugiere que el PD-L1 exosomal puede ofrecer indicios sobre el estado tumoral y posiblemente se convierta en un medio útil para verificar la progresión del cáncer.

Al analizar tanto la PD-L1 exosomal como soluble, se destaca que la mayor cantidad de proteína PD-L1 se encuentra en la fracción asociada a las vesículas extracelulares. Estas vesículas proporcionan información más relevante en comparación con otros factores solubles presentes en las biopsias líquidas.

En cuanto a las muestras de sangre y orina, se observó una mayor cantidad de PD-L1 en las muestras de sangre periférica en comparación con la orina. Sin embargo, ambos tipos de muestras permiten una cuantificación precisa mediante ELISA y están directamente relacionados con el estado tumoral. La orina puede ser una alternativa atractiva por su facilidad de obtención y rapidez, evitando procedimientos menores como la toma de sangre. No obstante, la muestra obtenida de suero podría ofrecer niveles más precisos para discernir cambios sutiles en la cantidad de PD-L1 en las vesículas extracelulares que circulan directamente.

La detección y cuantificación de PD-L1 exosomal tanto en el medio de cultivo de células tumorales como en el plasma de pacientes con neoplasias avanzadas PD-L1 positivo sugieren su potencial como biomarcador tumoral. Podría ser una herramienta efectiva tanto para el diagnóstico del cáncer como para evaluar el estado tumoral a lo largo del tiempo. Su facilidad de obtención a partir de biopsias líquidas como sangre u orina, junto con metodologías relativamente económicas y rápidas, hacen de este enfoque una opción prometedora en la investigación de marcadores tumorales.

9. Recomendaciones

Somos conscientes que el número de pacientes del presente trabajo fue bajo, al ser solo un estudio exploratorio, el tamaño de la muestra no es muy significativo pero creemos que el esfuerzo desarrollado es un gran paso para poder proponer un estudio clínico Fase 2 o fase 3 a las instituciones de salud del país, con el fin de poder ampliar la visión real de nuestra investigación de tal forma que el número de pacientes nos proporcione un tamaño de muestreo estadísticamente significativo para obtener resultados más exactos y podamos posicionar el Biomarcador tumoral PD-L1 exosomal como una herramienta útil para el beneficio de nuestros pacientes con cáncer y para los médicos que se enfrentan día a día al reto de tratar estos pacientes sin marcadores biológicos adecuados y por ende en muchas ocasiones al fracaso de su labor.

Consideramos que la técnica de purificación también debe ser más precisa por lo que se necesita más apoyo económico para esta iniciativa, que podría generar un biomarcador de seguimiento mucho más preciso y a bajo costo que sirva como herramienta para el manejo de este tipo de patologías tan complejas.

Bibliografía

- Abusamra, A. J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T. E., Chin, J. L., & Min, W. P. 2005. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 169-173.
- Antoni Ribas and Siwen Hu-Lieskovan What does PD-1 positive or negative mean. *J Exp Med*. 2016 Dec 12; 213(13): 2835–2840.
- Aguiar P, Del Giglio A, Alastair P et al Cost-effectiveness and budget impact of lung cancer immunotherapy in South America: strategies to improve Access, *Oncology central* 8 AUG 2018.
- Alborelli, I., Leonards, K., Rothschild, S. I., Leuenberger, L. P., Savic Prince, S., Mertz, K. D., Jermann, P. 2020. Tumor mutational burden assessed by targeted NGS predicts clinical benefit from immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *The Journal of pathology*, 250(1), 19-29.
- Addeo, A., Friedlaender, A., Banna, G. L., & Weiss, G. J. 2021. TMB or not TMB as a biomarker: That is the question. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 163, 103374.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, 116(2), 281-297.
- Chang, G. C., Yang, T. Y., Chen, K. C., Hsu, K., Huang, Y., Su, K., Yu, S., & Tseng, J. 2020. ALK variants, PD-L1 expression and their association with outcomes in ALK- positive NSCLC patients. *Scientific Reports*. 10, 21063.
- Chatterjee, S. K., & Zetter, B. R. 2005. Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future. *Future Oncology*. Feb;1(1):37-50.
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., ... & Guo, W. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382-386.
- Duréndez-Sáez, E.; Calabuig-Fariñas, S.; Torres-Martínez, S.; Moreno-Manuel, A.; Herreros-Pomares, A.; Escorihuela, E.; Mosqueda, M.; Gallach, S.; Guijarro, R.; Serna, E.; et al. Analysis of Exosomal Cargo Provides Accurate Clinical, Histologic and Mutational Information in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2022**, 14, 3216.
- Fernández-Messina, L., Gutiérrez-Vázquez, C., Rivas-García, E., Sánchez-Madrid, F., & de la Fuente, H. 2015. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biology of the Cell*, 107(3), 61-77.
- Filipazzi, P., Bürdek, M., Villa, A., Rivoltini, L., & Huber, V. (2012). Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. In *Seminars in cancer biology*. 22(4): 342-349. Academic Press.

- Frelaut, M., Le Tourneau, C., & Borcoman, E. (2019). Hyperprogression under immunotherapy. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2674.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. y Jemal, A. (2018). Estimaciones globales y regionales de la incidencia y mortalidad de 38 tipos de cáncer: GLOBOCAN 2018. *Organización Mundial de la Salud, Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer: Lyon, Francia, 14.*
- Girolami I, Pantanowitz L, Barberis M, Paolino G, Brunelli M, Vigliar e, Munari E, Satturwar S, troncone G, Eccher A. Challenges facing pathologists evaluating PD-L1 in Head and Neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2021 Oct;50(9):864-873. doi:10.1111/jop.13220. Epub 2021 Jul 8. PMID 34157159.
- Han, Y., Liu, D., & Li, L. 2020. PD-1/PD-L1 pathway: current research in cancer. *American Journal Cancer Research* 10(3):727-742.
- Hita-Millan, J., Carracedo, A., & Fernandez-Rozadilla, C. (2021, September 28). *Liquid biopsy biomarkers for immunotherapy in non-small cell lung carcinoma: Lessons learned and the road ahead.* *Journal of personalized medicine.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8540302>.
- Herbst, R. S., Soria, J. C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., & Sandler, A. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, 515(7528), 563-567.
- Ji, M., Liu, Y., Li, Q., Li, X. D., Zhao, W. Q., Zhang, H., ... & Wu, C. P. 2015. PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. *Journal of translational medicine*, 13(1), 1-6.
- Kim, D. H., Kim, H., Choi, Y. J., Kim, S. Y., Lee, J. E., Sung, K. J., Sung, Y. H., Pack, C., Jung, M., Hahn, B., Kim, K., Kim, W. S., Nam, S. J., Choi, S., Yun, M., Lee, J. C., & Rho, J. K. (2019). Exosomal PD-L1 promotes tumor growth through immune escape in non-small cell lung cancer. *Experimental & molecular medicine*, 51(8), 1-13.
- Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23–34. PMID: 26027431. doi:10.1056/NEJMoa1504030.
- Li, Z., Song, W., Rubinstein, M. *et al.* Recent updates in cancer immunotherapy: a comprehensive review and perspective of the 2018 China Cancer Immunotherapy Workshop in Beijing. *J Hematol Oncol* 11, 142 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0684-3>.
- Li, C., Li, C., Zhi, C. *et al.* Clinical significance of PD-L1 expression in serum-derived exosomes in NSCLC patients. *J Transl Med* 17, 355 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2101-2>.
- Litvin, I. E., Paganella, M. P., Wendland, E. M., & Roehe, A. V. (2020). Prognosis of PD-L1 in human breast cancer: Protocol for a systematic review and meta-Analysis. *Systematic*

Reviews, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13643-020-01306-9/TABLES/1>.

- Markus Eckstein, Alessia Cimadamore, Arndt Hartmann, Antonio Lopez-Beltran, Liang Cheng, Marina Scarpelli, Rodolfo Montironi, and Thomas Gevaert. PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: a practical approach *Ann Transl Med.* 2019 Nov; 7(22): 690. doi: 10.21037/atm.2019.10.24.
- Marrugo-Ramirez, J., Mir, M., & Samitier, J. 2018. Blood Based Cancer Biomarkers in Liquid biopsy: A Promising Non-invasive Alternative to Tissue Biopsy. *International Journal of Molecular Sciences.* 19,2877.
- Melo, S. A., Sugimoto, H., O'Connell, J. T., Kato, N., Villanueva, A., Vidal, A., Que, L., Vitkin, E., Perelman, L. T., Melo, C., Lucci, A., ... & Kalluri, R. (2014). Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer cell*, 26(5), 707-721.
- Michael M. Boyiadzis, John M. Kirkwood, John L. Marshall, Colin C. Pritchard, Nilofer S. Azad, and James L. Gulley. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer.* 2018; 6: 35. Published online 2018 May 14. doi: 10.1186/s40425-018-0342-x.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2022). Infografías cáncer en cifras INC - Instituto Nacional de Cancerología. <https://www.cancer.gov.co/portafolio-1/salud-publica/grupos/grupo-vigilancia-epidemiologica-del-cancer/infografias-cancer-cifras-inc>.
- Nunes-Xavier, C. E., Angulo, J. C., Pulido, R., López, J. I. (2019). A critical insight into the clinical translation of PD-1/PD-L1 blockade therapy in clear cell renal cell carcinoma. *Current urology reports*, 20(1), 1.
- O'Keeffe, L. M., Taylor, G., Huxley, R. R., Mitchell, P., Woodward, M., & Peters, S. A. (2018). Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 8(10), e021611.
- Passiglia, F., Rizzo, S., Di Maio, M., Galvano, A., Badalamenti, G., Listì, A., Russo, A. 2018. The diagnostic accuracy of circulating tumor DNA for the detection of EGFR-T790M mutation in NSCLC: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports*, 8(1), 1- 10.
- Rabinowits, G., Gercel-Taylor, C., Day, J. M., Taylor, D. D., & Kloecker, G. H. 2009. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin.Lung Cancer.*10:42-46.
- Salmaninejad, A., Valilou, S. F., Shabgah, A. G., Aslani, S., Alimardani, M., Pasdar, A., & Sahebkar, A. (2019). PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of cellular physiology*, 234(10), 16824-16837.
- Sanmamed, M. F., & Chen, L. (2014). Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer journal*, 20(4), 256.
- Sharpe, A., Pauken, K. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 18, 153–167 (2018). <https://doi.org/10.1038/nri.2017.108>.
- Shephard, Alex P. et al. "Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor

microenvironment.” *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 3 (2017): 288.

Sispro. (2020). Boletín No. 01 Día mundial del cáncer de pulmón. https://www.sispro.gov.co/observatorios/oncancer/Paginas/onc_boletin_01_cancer_pulmon.aspx.

Szu- Chun Yang, Huang-Tz Ou.(2023) .Cost effectiveness of first line immunotherapies for advanced non-small cell lung cancer. *Cancer medicine*, 18 January 2023. <https://doi.org/10.1002/cam4.5632>.

Tan, S., Zhang, CH. & Gao, G. Seeing is believing anti-PD-1/PD-L1 monoclonal antibodies in action for checkpoint blockade tumor immunotherapy. *Sig Transduct Target Ther* 1, 16029 (2016). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2016.29>.

The Global Cancer Observatory. (2020). Cancer Today. Globocan. <https://gco.iarc.fr/today/>

Wang M., Zhao J., Zhang L., Wei F., Lian Y., Wu Y., Guo C. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J. Cancer*. 2017; 8:761–773. doi: 10.7150/jca.17648.

Webber, J., Yeung, V., & Clayton, A. (2015, April). Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 40, pp. 27-34). Academic Press.

Whiteside, T. L. (2018). The emerging role of plasma exosomes in diagnosis, prognosis, and therapies of patients with cancer. *Contemporary Oncology*, 22(1A), 38.

Whiteside, T. L. (2016). Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1216-1223.

Wu, M., Huang, Q., Xie, Y. *et al*. Improvement of the anticancer efficacy of PD-1/PD-L1 blockade via combination therapy and PD-L1 regulation. *J Hematol Oncol* 15, 24 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01242-2>.

Xu, F., Fei, Z., Dai, H., Xu, J., Fan, Q., Shen, S., Zhang, Y., Ma, Q., Chu, J., Peng, F., Zhou, F., Liu, Z., & Wang, C. (2022). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles with High PD-L1 Expression for Autoimmune Diseases Treatment. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 34(1). <https://doi.org/10.1002/ADMA.202106265>.

Yarchoan, M., Lee, A., Hopkins, A., Montesion, M., Murugesan, K., Vithayathil, T., Zaidi, N., Azad, N., Laheru, D., Frampton, G., Jaffee, E. (2019). PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers. *JCI insight*. 4. 10.1172/jci.insight.126908.

Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. *et al*. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci* 9, 19 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>.

Zhang, X., Yuan, X., Shi, H., Wu, L., Qian, H., & Xu, W. (2015). Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of hematology & oncology*, 8(1), 1-131.

Zhang, J., Yan, Y., Li, J., Adhikari, R., & Fu, L. (2020, April 30). PD-1/PD-L1 based combinational cancer therapy: Icing on the cake. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.00722/full>.