

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de un procedimiento de biopsia líquida para evaluación de la respuesta a la inmunoterapia en cáncer.

Código de proyecto ANII: FSS_X_2022_1_172993

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2024

OSINAGA PRADERE, Eduardo (Responsable Técnico - Científico)

TOUYA OLSEN-BOJE, Diego (Co-Responsable Técnico-Científico)

BEROIS MALÁN, Nora Mabel (Investigador)

BERRIEL RAMON, Edgardo Iber (Investigador)

BÓDEGA TESTONI, Laura (Investigador)

MALVASIO, Silvina (Investigador)

MORENO, Laura (Investigador)

PITTINI PEREZ, Álvaro Gustavo (Investigador)

PORRO ACHARD, Valentina (Investigador)

SANTANA, Diego (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \\\

ADMINISTRACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO. HOSPITAL MACIEL \\\ FACULTAD DE MEDICINA. FUNDACIÓN MANUEL PEREZ

Resumen del proyecto

La inmunoterapia del cáncer utilizando anticuerpos contra PD1/PD-L1 constituye uno de los mayores progresos terapéuticos de la última década. PD-L1 se encuentra en células tumorales e inmunitarias del microambiente tumoral. Al unirse al receptor PD-1, inhibe la activación de linfocitos T. Actualmente se investiga intensamente buscando biomarcadores precisos que identifiquen pacientes que respondan mejor a este tipo de inmunoterapia. La biopsia líquida puede ser una muy buena posibilidad. El PD-L1 en sangre incluye diferentes fracciones, como soluble (sPD-L1) y en exosomas (exo-PD-L1). El aumento de sPD-L1 y exo-PD-L1 puede inhibir linfocitos T, afectando la respuesta a la inmunoterapia. Aún no se ha definido el mejor procedimiento para evaluar PD-L1 en biopsia líquida. En este trabajo comparamos dos estrategias de ELISA para cuantificar sPD-L1 y exo-PD-L1, una con anticuerpos anti-PD-L1/anti-PD-L1 y otra con anti-antígeno Tn/anti-PD-L1. Se obtuvo plasma de 10 individuos controles sanos y de 37 pacientes con cáncer, incluyendo tumores de pulmón, riñón, piel, orofaríngeo, estómago y cuello uterino, previo al inicio de la inmunoterapia. La purificación de microvesículas se demostró mediante microscopía electrónica. Los dos tipos de ELISA mostraron capacidad para detectar PD-L1 en sangre, tanto en plasma total como en exosomas. La mayor especificidad se observó para exo-PD-L1 con anti-PD-L1/anti-PD-L1 y con antígeno Tn/PD-L1 en plasma. En pacientes con cáncer, la mayor sensibilidad se vio para ambos métodos en plasma. En algunos pacientes los cambios en los niveles de sPD-L1 mostraron buena correlación con la respuesta al tratamiento. Conclusiones: la detección de sPD-L1 utilizando el método antígeno Tn/PD-L1 mostró la mejor relación sensibilidad/especificidad, que podría predecir la respuesta a la inmunoterapia. Este método aparece como una nueva estrategia para detectar PD-L1 en biopsia líquida. Se requiere de una casuística mayor, con seguimiento prolongado, para concluir sobre la utilidad clínica de los métodos utilizados.

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Inmunoterapia del cáncer

Palabras clave: Inmunoterapia del cáncer / PD-L1 / Biopsia líquida /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Un mayor conocimiento de la biología del cáncer está haciendo realidad la medicina personalizada, considerando que cada paciente es único, al permitir la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos que influyen en las decisiones terapéuticas. Con esto se están logrando resultados clínicos muy superiores para los pacientes a la vez que se racionalizan recursos, se ahorra tiempo y dinero al permitir evitar tratamientos que no aportarán resultados favorables. El uso de inhibidores de la proteína PD-1 (Programmed cell death protein 1) y de su ligando PD-L1 (programmed cell death-ligand 1) se han convertido en procedimientos estándar para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Saxena, 2020). En comparación con los tratamientos convencionales, la monoterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1 puede prolongar significativamente la sobrevida sin efectos secundarios importantes en el tratamiento de tumores avanzados (Qu, 2021). Este tipo de inmunoterapia ha revolucionado las estrategias para el tratamiento del cáncer, ya que tiene como objetivo activar el sistema inmunológico mediante la inhibición de puntos de control inmunitarios (Ribas and Wolchok, 2018). Desafortunadamente, sólo en 20-40% de los pacientes se obtienen beneficios clínicos duraderos utilizando inhibidores de PD-1/PD-L1 (Borghaei, 2015, Brahmer, 2015, Herbst, 2016), lo que se debe en la mayoría de los casos, a que los pacientes presentan resistencia primaria o adquirida a la inmunoterapia de estos puntos de control (Weiss and Sznol, 2021).

Este contexto, sumado al alto costo de los anticuerpos anti- PD-1/PD-L1, plantea la gran necesidad de identificar pacientes potencialmente respondedores y no respondedores. En la práctica clínica, el biomarcador predictivo más utilizado es la expresión de PD-L1 evaluada por inmunohistoquímica en muestras tumorales obtenidas mediante biopsia. Sin embargo, esta estrategia es de utilidad limitada y controvertida, ya que numerosos pacientes con tumores negativos para PD-L1 también pueden responder a esta inmunoterapia (Niu, 2021). La expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica sigue siendo técnica y biológicamente insuficiente, principalmente debido a la heterogeneidad intratumoral, así como diferentes niveles de expresión de PD-L1 entre las lesiones primarias y metastásicas. Actualmente, el diagnóstico basado en la búsqueda de elementos tumorales circulantes (biopsia líquida) está revolucionando las posibilidades diagnósticas, ya que representa mejor la carga tumoral global del paciente y siendo una muestra de más fácil obtención, permite el control seriado y seguimiento molecular de la enfermedad en tiempo real. En el presente proyecto buscamos generar conocimiento en esta área, realizando la cuantificación de PD-L1 en biopsia líquida, tanto en plasma como en exosomas purificados.

Los exosomas son vesículas extracelulares de bicapa lipídica, biológicamente activas, con tamaños que oscilan entre 30 y 150 nm (van Niel, 2018), producidas y liberadas naturalmente por diferentes tipos de células normales y tumorales (Kalluri, 2016; Zhang and Yu, 2019). Estas vesículas cumplen un papel importante en la comunicación intercelular e influyen en el entorno extracelular y las respuestas del sistema inmunológico. Las células tumorales pueden producir activamente grandes niveles de exosomas enriquecidos en contenidos celulares que participan en el desarrollo del cáncer y las metástasis (Greening, 2015, Yi, 2020). PD-L1 se encuentra en la

superficie de exosomas liberados por células tumorales y se ha demostrado la presencia de exosomas PD-L1 en sangre de paciente con diferentes tipos de tumores como melanoma (Chen, 2018), cáncer de mama (Yang, 2018), glioblastoma (Ricklefs, 2018), cáncer de cabeza y cuello (Theodoraki, 2018) y cáncer de pulmón (Del Re, 2018). Estos exosomas PD-L1 pueden mediar un importante efecto inmunosupresor de la misma manera que el receptor ubicado en la superficie celular (Zhou, 2020). El PD-L1 exosómico es estable, no se degrada fácilmente por las enzimas proteolíticas y su potente efecto inmunosupresor sugiere el interés significativo que su evaluación puede tener en pacientes oncológicos (Tang, 2020).

Se encontró que los niveles plasmáticos de PD-L1 expresados en exosomas, pero no el soluble, se asocian con la progresión de la enfermedad y las características clínico-patológicas en pacientes con cáncer (Theodoraki, 2018; Li, 2019). Se ha demostrado una asociación significativa entre los niveles de PD-L1 exosomal circulante y la tasa de respuesta a la terapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 (Wang, 2021). Su importancia clínica se ha reportado para pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Theodorak, 2018; Theodorak, 2019) cáncer gástrico (Fan, 2019), cáncer de pulmón (Li, 2019), cáncer de páncreas (Lux, 2019) y melanoma (Chen, 2018). Sin embargo, diversas evidencias clínicas y preclínicas controversiales han mostrado que los exosomas PD-L1 pueden inducir una menor tasa de respuesta a los tratamientos anti-tumorales con anticuerpos anti- PD-1/ PD-L1 (Yin, 2021). En pacientes con melanoma, los niveles altos de PD-L1 exosomal circulante antes del tratamiento se correlacionaron con peor respuesta al Pembrolizumab (Chen, 2018), lo que ha llevado a plantear que la eliminación de los exosomas PD-L1 circulantes podría servir como estrategia para mejorar la eficacia de la terapia anti-PD1/PD-L1 en oncología (Yin, 2021).

En los últimos años se ha trabajado intensamente en la búsqueda de biomarcadores que identifiquen los grupos de pacientes que obtengan el mejor beneficio del tratamiento con anticuerpos inhibidores de PD1/PD-L1 (Niu, 2021). Diferentes factores pueden influir en el resultado de estos tratamientos y los tres procedimientos que han sido aprobados por la FDA son: a) el análisis inmunohistoquímico de expresión de PD-L1 en las células tumorales, cuyo valor es limitado; b) la inestabilidad de microsatélites, aplicable a pocos tipos de cáncer; y) la carga de mutaciones tumorales (TMB), que requiere estudio de paneles de genes mediante secuenciación masiva. También emergen como parámetros de interés el análisis de los subtipos de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), y la presencia de neoantígenos tumorales. Existe una necesidad insatisfecha de biomarcadores no invasivos o mínimamente invasivos como el análisis de una muestra de sangre, tanto para el diagnóstico, como para la monitorización de estos tratamientos de inmunoterapia.

La naturaleza no invasiva de los estudios de biopsia líquida ofrece una clara oportunidad en este campo para pacientes con cáncer, en quienes el control de la enfermedad por biopsias repetidas constituye un procedimiento extremadamente invasivo y muchas veces el abordaje de las lesiones tumorales puede ser inaccesible. Por otra parte, las muestras de biopsias de tejido pueden no reflejar con precisión el estado molecular de un tumor debido a la existencia de heterogeneidad intratumoral. Teniendo en cuenta los riesgos, molestias para el paciente, los desafíos logísticos incluido el alto costo que limitan la aplicación de biopsias intervencionistas, la biopsia líquida presenta una oportunidad atractiva para el diagnóstico molecular mínimamente invasivo (De Mattos-Arruda and Siravegna, 2021). Mientras que una biopsia de tejido proporciona una instantánea del tumor en un tiempo y localización determinados, la biopsia líquida tiene el potencial de proporcionar información sobre el perfil molecular de la carga tumoral global del paciente, tanto al comienzo del tratamiento como en la monitorización en tiempo real de la evolución de la enfermedad, pudiendo captar la heterogeneidad molecular dinámica (Pinzani, 2021). Esto resulta de particular importancia para el manejo de pacientes con cáncer avanzado debido a la gran dificultad para obtener una muestra de tejido en algunos casos (Cecchini and Yi, 2020).

La biopsia líquida basada en el análisis de ciertas mutaciones en ADN tumoral circulante libre en plasma (cfDNA, cell free DNA) ha recibido aprobación de la FDA como marcador predictivo de respuesta a inhibidores de tirosina-kinasa en pacientes con cáncer de pulmón (Leighl, 2019). Recientemente han surgido evidencias sobre el interés de la caracterización molecular de los exosomas circulantes como procedimiento de biopsia líquida (Urabe, 2020), debido a que los mismos transportan moléculas específicas de las células tumorales, como proteínas, miARN, ARNm, ARN largo no codificante (lncRNA) y lípidos, aportando información crucial sobre el estado de la enfermedad en un momento dado. En este contexto los exosomas PD-L1 circulantes en la sangre surgen como biomarcadores de utilidad para predecir la respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 (Mathew, 2020). Como analizamos previamente, la evidencia acumulada indica que los exosomas PD-L1 están involucrados en la intercomunicación inmunológica y tienen el potencial de ser un biomarcador revolucionario para la inmunoterapia del cáncer (Guo, 2017).

En el presente proyecto buscamos desarrollar un procedimiento de biopsia líquida para mejorar posibilidades de respuesta a los tratamientos con anticuerpos anti-PD1/PD-L1, comparando con procedimientos ya reportados y aún no disponibles en nuestro país.

Objetivos específicos de la investigación fueron:

1) Desarrollar y optimizar procedimientos de biopsia líquida para la detección de exosomas PD-L1, asociando anticuerpos específicos de cáncer con anticuerpos anti-PD-L1. Ya se ha comunicado un método con buena performance para la detección de exosomas PD-L1 en plasma sanguíneo (Chen et al., 2018), que utiliza un ELISA con anticuerpos anti-PD-L1 tanto en la captura en fase sólida como en el revelado. Sin embargo, su estricta especificidad en muestras clínicas podría cuestionarse ya que PD-L1 se expresa también en diferentes células normales, tanto de origen hematopoyético (linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y mastocitos),

como en otras células normales, incluidas las endoteliales vasculares, queratinocitos, células de los islotes pancreáticos, astrocitos y placenta (Sun et al., 2018). Nuestra hipótesis es que la especificidad del procedimiento puede ser mayor si se efectúa la inmunocaptura de los exosomas utilizando anticuerpos que reconozcan antígenos muy específicos de cáncer, revelando luego con un anticuerpo anti-PD-L1. Nuestro equipo de investigación ha caracterizado extensamente al antígeno Tn (altamente específico de carcinomas y no expresado por células normales del organismo (Ju et al., 2013). Este antígeno, que se expresa en la superficie de las células de carcinomas, podría ser utilizado para la captura, mediante un anticuerpo monoclonal específico, de exosomas liberados por las mismas. Por lo tanto, propusimos desarrollar un nuevo método para la detección de exosomas-PD-L1 y compararlo con el ya existente.

2) Comparar la sensibilidad y especificidad de los tests utilizando plasma de pacientes con cáncer y controles normales. Evaluamos la sensibilidad y la especificidad comparando resultados obtenidos con muestras de individuos normales y pacientes con cáncer.

3) Correlacionar el nivel de PD-L1 en exosomas y plasma con la respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 en pacientes con cáncer.

Metodología/Diseño del estudio

- El proyecto de investigación fue registrado en el Ministerio de Salud Pública (Registro MSP-7316530) y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Maciel (3/2/2023).

- Se obtuvo sangre de 47 individuos, que incluyó 37 pacientes con cáncer, previo al inicio de la inmunoterapia. Se recabó el consentimiento de los pacientes mediante formulario informativo. Se estudiaron pacientes con tumores de pulmón, riñón, piel, orofaríngeo, estómago y cuello uterino (Tabla I). Los controles normales correspondieron a 10 donantes de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital Maciel.

- Plasma y aislamiento de exosomas. De cada individuo se obtuvieron 9 ml de sangre, utilizando tubos con EDTA. Luego de centrifugación de la sangre a 3.000 rpm, la mitad del plasma se utilizó para la purificación de exosomas y la otra mitad para el estudio de PD-L1 soluble en plasma total (Figura 1-A). La purificación de exosomas se realizó a partir de plasma libre de células y de vesículas grandes (centrifugación a 16.500 g durante 45 min). Utilizamos el sobrenadante para la purificación de los exosomas empleando un kit comercial específico para este propósito (Thermo Fisher, Cat# 4484450), siguiendo el procedimiento comunicado por Chen et al. con el que previamente se obtuvieron muy buenos resultados (Chen et al., 2018). La obtención de exosomas del plasma se demostró mediante microscopía electrónica (Figura 1-B), realizada en el servicio de la Facultad de Ciencias (UdelaR).

- Métodos ELISA para la detección de PD-L1 en plasma y exosomas (Figura 1-C). Comparamos los resultados obtenidos con dos métodos diferentes: Uno de ellos, denominado PD-L1/PD-L1, se realizó en placas de ELISA (96 pocillos) sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 5H1 (Sigma). Luego del bloqueo de los sitios libres se incubaron con muestras de plasma toda la noche a 4°C. Luego del lavado del material no unido se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 MIH1 biotinilado (eBioscience) durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de incubación con estreptavidina-peroxidasa y revelado con tetrametilbencidina (TMB). La lectura colorimétrica se realizó a 450 nm y como referencia utilizamos la proteína PD-L1 humana recombinante (I + D Systems, Cat # 156-B7) para hacer una curva estándar. La concentración de PD-L1 en la superficie de los exosomas aislados se determinó basado en el rango lineal de los datos del ensayo ELISA.

La optimización del otro método para la identificación de exosomas PD-L1, denominado antígeno Tn/PD-L1, se basó en la captura de los exosomas utilizando un anticuerpo monoclonal específico de cáncer (83D4) que reconoce al anti-antígeno Tn (Osinaga et al., 2000). Este procedimiento presentó la diferencia con el descrito más arriba en que la sensibilización de la placa de ELISA se realizó con el anticuerpo 83D4, en lugar de utilizar el anticuerpo anti-PD-L1 5H1. Luego de la incubación con la muestra a estudiar, se adicionó el anti-PD-L1 marcado y el revelado se realizó como en el primer procedimiento.

Cuando fue posible, en los pacientes se obtuvo una segunda muestra de sangre a los 2 meses de iniciado el tratamiento de inmunoterapia, para comparar con los niveles iniciales de PD-L1 circulante. Los resultados de laboratorio se compararon con la información clínico-patológica para cada paciente, en particular lo referente a la respuesta a la inmunoterapia anti-PD1-PD-L1.

Resultados, análisis y discusión

El proyecto buscó evaluar estrategias de biopsia líquida para detectar PD-L1 en pacientes con cáncer. Para ello nos planteamos las siguientes preguntas:

a) ¿es mejor trabajar con los exosomas purificados del plasma o con plasma total (donde están presentes los exosomas + proteínas PD-L1 solubles)?

b) ¿es mejor utilizar un método que detecte todos los exosomas PD-L1 (provenientes de células tumorales y normales) o emplear un procedimiento que principalmente capte exosomas de células cancerosas y sobre ellos detectar PD-L1?

Para responder a estas interrogantes optimizamos dos procedimientos de ELISA (Figura 1-A), en donde con el PD-L1/PD-L1 podemos detectar todo el PD-L1 plasma (proteína soluble y exosomas); mientras que con el método antígeno Tn/PD-L1 evaluamos la presencia de PD-L1 en exosomas principalmente de origen tumoral.

En la Figura 2 se muestra la comparación de los resultados obtenidos en plasma total con respecto a los exosomas purificados, utilizando el método PD-L1/PD-L1, para la población de pacientes con cáncer. Se observa que la mayoría de los casos positivos en exosomas, también lo fueron en plasma total. Las dos excepciones fueron los pacientes 13 y 20, que resultaron positivos en exosomas y no en plasma. Por el contrario, varios pacientes (2, 3, 8, 17, 33 y 36) fueron positivos PD-L1 en plasma y no en exosomas.

En la Figura 3 se muestra la comparación plasma vs exosomas para el método antígeno Tn/PD-L1. Un número importante de pacientes fueron PD-L1 positivos en plasma y no en exosomas para este procedimiento. Sin embargo, los pacientes 20 y 28 fueron positivos en exosomas y no en plasma.

Es importante la constatación de la alta concordancia de los resultados obtenidos con los procedimientos de ELISA PD-L1/PD-L1 y antígeno Tn/PD-L1 en plasma total de los pacientes con cáncer (Figura 4); lo que sugiere que la sensibilidad para la detección de PD-L1 es muy similar entre ambos procedimientos.

Para determinar la especificidad de los procedimientos para detectar PD-L1 circulante en pacientes con cáncer, estudiamos 10 individuos controles sanos, correspondientes a donantes de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital Maciel. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos con ambos procedimientos de ELISA, tanto para plasma total como para exosomas purificados. Los mejores resultados de especificidad se observaron para PD-L1/PD-L1 en exosomas purificados y para antígeno Tn/PD-L1 en plasma total.

Analizados globalmente los resultados de sensibilidad y especificidad, observamos que ambos métodos ELISA basados en la detección de PD-L1 en plasma total fueron más sensibles que los tests que analizaron a los exosomas purificados. Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de He y cols. (2023) y Shin y cols. (2023). Ello podría explicarse por diferentes motivos:

- el método PD-L1/PD-L1 tiene la posibilidad de identificar tanto al PD-L1 presente en la superficie de los exosomas como a las moléculas de PD-L1 que circulan solubles en el plasma (Daassi y col., 2020). Ello puede tener importancia biológica, ya que ambas formas de PD-L1 pueden afectar la respuesta a la inmunoterapia (Zhang y col., 2024).

- lo expresado más arriba no puede explicar la mayor sensibilidad en plasma del método antígeno Tn/PD-L1, debido a que la molécula PD-L1 no contiene Tn, por lo que este test no puede detectar a PD-L1 soluble libre en plasma. La detección por este procedimiento se basa en captar a los exosomas Tn positivos, los cuales pueden expresar a PD-L1. Por lo tanto, la mayor sensibilidad del método antígeno Tn/PD-L1 con muestras de plasma total seguramente se debe a que capta más exosomas PD-L1+ del plasma total que en la muestra de exosomas purificados. Ello puede estar relacionado con pérdida, que suele ocurrir, durante un proceso de purificación de moléculas o componentes celulares (exosomas en este caso).

Por otra parte, globalmente considerados, los procedimientos con mejor especificidad (resultado negativo o con bajos niveles en las muestras de los individuos controles sanos) fueron el método PD-L1/PD-L1 estudiando los exosomas purificados y el método antígeno Tn/PD-L1 en muestras de plasma total. Por lo tanto, la mejor relación entre sensibilidad y especificidad la observamos para método antígeno Tn/PD-L1. Este hallazgo es muy interesante, porque se trata de un desarrollo original, no publicado, a diferencia de método PD-L1/PD-L1.

En diversos trabajos, donde se ha estudiado la relación ente PD-L1 en biopsia líquida y la respuesta de los pacientes a la inmunoterapia, sólo se ha tenido en cuenta, el valor de PD-L1 al inicio del tratamiento (Széles y col., 2023; Hayashi y col., 2024). Por otra parte, en otros trabajos se ha observado que puede ser de mayor utilidad obtener dos muestras de sangre, una previo al inicio de la inmunoterapia y otra luego de iniciado el tratamiento, habitualmente a los dos meses (Constantini y cols. 2018; He y cols., 2024; Oya y cols., 2024). En nuestro proyecto, pudimos obtener una segunda muestra de sangre en 12 pacientes, a los dos meses de iniciado el tratamiento. En las Figuras 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos para esos pacientes, con ambos métodos de diagnóstico de PD-L1, para plasma total y exosomas.

Para concluir sobre la utilidad clínica de los resultados obtenidos se requiere evaluar la sobrevida global y el tiempo libre de enfermedad de los pacientes, lo que requiere de varios años de seguimiento clínico. Esa información no fue posible de obtener aún, ante la corta duración del proyecto. Sin embargo, observamos algunos casos donde se constató una clara respuesta favorable al tratamiento con inmunoterapia anti-PD1/PD-L1. Son el paciente 14 (cáncer escamoso de piel) y el 19 (cáncer de riñón a células claras). En el paciente 14 ocurrió una muy evidente disminución de PD-L1 circulante, de forma coincidente al ser evaluado por los dos métodos,

tanto en plasma como en exosomas. Esta observación es coherente con la disminución observada en PD-L1 plasmático para la mayoría de los tumores, incluidos los cánceres de piel (Scirocchi y cols., 2022). Por el contrario, en el paciente 19 se observó un aumento significativo de PD-L1 circulante, resultado también coincidente entre las cuatro determinaciones realizadas (figuras 6 y 7). En el caso de los cánceres de riñón, se ha comunicado que la respuesta a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 se asocia con aumento del PD-L1 del plasma (Incorvaia y cols., 2020).

Los resultados obtenidos son muy alentadores y nuestro plan de trabajo no se detiene con el cumplimiento del cronograma del proyecto. Entendemos fundamental incorporar más pacientes a este tipo de análisis y poder realizar un seguimiento clínico de duración acorde para documentar la respuesta o no a la inmunoterapia.

Conclusiones y recomendaciones

Luego de 18 meses de actividad en el proyecto, que implicó la compra de equipos e insumos, el desarrollo y la optimización de los métodos de ELISA, el reclutamiento gradual de los pacientes, los estudios de biopsia líquida y la evaluación de la evolución de cada enfermo, podemos concluir:

- El proyecto permitió incorporar al Hospital Maciel, por primera vez en nuestro país, la posibilidad de analizar a la molécula PD-L1 en biopsia líquida, método no invasivo de potencial utilidad para evaluar la respuesta de pacientes a la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1.
- Se transfirió al Laboratorio de Oncología Molecular del Hospital Maciel el procedimiento el PD-L1/PD-L1, utilizado en diversos laboratorios del mundo, pero que aún no está aprobado para diagnóstico médico.
- Se generó un nuevo desarrollo (antígeno Tn/PD-L1), que mostró similar sensibilidad con mayor especificidad con respecto al método PD-L1/PD-L1. Si en la continuidad del trabajo en curso se confirman estos resultados, existirían posibilidades de patentar al nuevo método.
- La correlación con la respuesta al tratamiento, aún muy preliminar, mostró casos en donde los cambios en el nivel de PD-L1 en plasma se asociaron con la respuesta a la inmunoterapia.
- El proyecto favoreció la formación de recursos humanos en esta nueva área del diagnóstico, en particular la Q.F. Eugenia Fernández (estudiante de Doctorado PEDECIBA sobre la temática de biopsia líquida en cáncer) y los Dres. Diego Santana y Mariana Carrasco (residentes de Oncología, realizando tesis de Maestría Pro.In.Bio.).
- La actividad del proyecto fue fundamental para consolidar un nuevo ámbito de investigación básico-clínico en el Hospital Maciel, en colaboración con el Depto. de Inmunobiología de la Facultad de Medicina (UdelaR). La riqueza de este ámbito fortalece también las posibilidades de trasladar los conceptos y herramientas moleculares a la práctica clínica.
- Una de las recomendaciones que podemos sugerir, es que teniendo en cuenta el alto impacto que en el ámbito médico suelen tener los proyectos financiados por el Fondo Sectorial de Salud, las aperturas de estos llamados se realicen con mayor frecuencia.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Presentación en evento	Biopsia líquida de PD-L1 en pacientes oncológicos. Comparación de tres métodos de detección.	Eugenia Fernández, Diego Touya, Diego Santana, Lucía Argencio, Laura Vera, Wilson Golomar, Laura Cawen, Carlos Meyer, Silvina Malvasio, Nabila Elgul, Marcos Acosta, Gabriela Moreira, Aracely Ferrari, Beatriz Villar, Juan Ferrari, Nora Berois y Eduardo Osinaga		https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/46324	Finalizado

Referencias bibliográficas

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufel M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373:1627-39

Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015; 373:123-35.

Cecchini MJ, Yi ES. Liquid biopsy is a valuable tool in the diagnosis and management of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2020; 12:7048-7056.

Chen G, Huang AC, Zhang W, Zhang G, Wu M, Xu W, Yu Z, Yang J, Wang B, Sun H, Xia H, Man Q, Zhong W, Antelo LF, Wu B, Xiong X, Liu X, Guan L, Li T, Liu S, Yang R, Lu Y, Dong L, McGettigan S, Somasundaram R, Radhakrishnan R, Mills G, Lu Y, Kim J, Chen YH, Dong H, Zhao Y, Karakousis GC, Mitchell TC, Schuchter LM, Herlyn M, Wherry EJ, Xu X, Guo W. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 2018; 560:382-386

Costantini A, Julie C, Dumenil C, Hélias-Rodzewicz Z, Tisserand J, Dumoulin J, Giraud V, Labrune S, Chinet T, Emile JF, Giroux Leprieur E. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology*. 2018; 7:e1452581. doi: 10.1080/2162402X.2018.1452581

Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20:209-215. doi: 10.1038/s41577-019-0264-y.

De Mattos-Arruda L, Siravegna G. How to use liquid biopsies to treat patients with cancer. *ESMO Open*. 2021; 6:100060

Del Re M, Marconcini R, Pasquini G, Rofi E, Vivaldi C, Bloise F, Restante G, Arrigoni E, Caparello C, Bianco MG, Crucitta S, Petrini I, Vasile E, Falcone A, Danesi R. PD-L1 mRNA expression in plasma-derived exosomes is associated with response to anti-PD-1 antibodies in melanoma and NSCLC. *Br J Cancer*. 2018; 118:820-824.

Fan Y, Che X, Qu J, Hou K, Wen T, Li Z, Li C, Wang S, Xu L, Liu Y, Qu X. Exosomal PD-L1 Retains Immunosuppressive Activity and is Associated with Gastric Cancer Prognosis. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26:3745-3755.

Greening DW, Gopal SK, Xu R, Simpson RJ, Chen W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2015; 40:72-81

Guo W, Gao Y, Li N, Shao F, Wang C, Wang P, Yang Z, Li R, He J. Exosomes: New players in cancer. *Oncol Rep*. 2017; 38:665-675.

Hayashi H, Chamoto K, Hatae R, Kurosaki T, Togashi Y, Fukuoka K, Goto M, Chiba Y, Tomida S, Ota T, Haratani K, Takahama T, Tanizaki J, Yoshida T, Iwasa T, Tanaka K, Takeda M, Hirano T, Yoshida H, Ozasa H, Sakamori Y, Sakai K, Higuchi K, Uga H, Suminaka C, Hirai T, Nishio K, Nakagawa K, Honjo T. Soluble immune checkpoint factors reflect exhaustion of antitumor immunity and response to PD-1 blockade. *J Clin Invest*. 2024; 134:e168318. doi: 10.1172/JCI168318.

He Y, Zhang X, Zhu M, He W, Hua H, Ye F, Zhou X, Chen N, Li Y, Zhong W, Wu G, Cai H, Jiang W. Soluble PD-L1: a potential dynamic predictive biomarker for immunotherapy in patients with proficient mismatch repair colorectal cancer. *J Transl Med*. 2023; 21:25. doi: 10.1186/s12967-023-03879-0

Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, Molina J, Kim JH, Arvis CD, Ahn MJ, Majem M, Fidler MJ, de Castro G Jr, Garrido M, Lubiniecki GM, Shentu Y, Im E, Dolled-Filhart M, Garon EB. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387:1540-1550.

Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Porta C, Olive D, De Luca I, Brando C, Rizzo M, Messina C, Rediti M, Russo A, Bazan V, Iovanna JL. Baseline plasma levels of soluble PD-1, PD-L1, and BTN3A1 predict response to nivolumab treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma: a step toward a biomarker for therapeutic decisions. *Oncoimmunology*. 2020; 9:1832348. doi: 10.1080/2162402X.2020.1832348.

Ju T, Wang Y, Aryal RP, Lehoux SD, Ding X, Kudelka MR, Cutler C, Zeng J, Wang J, Sun X, Heimburg-Molinari J, Smith DF, Cummings RD. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics Clin Appl*. 2013; 7:618-31

Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest* 2016; 126:1208–15

Leighl NB, Page RD, Raymond VM, Daniel DB, Divers SG, Reckamp KL, Villalona-Calero MA, Dix D, Odegaard JI, Lanman RB, Papadimitrakopoulou VA. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019; 25:4691-4700

Li C, Li C, Zhi C, Liang W, Wang X, Chen X, Lv T, Shen Q, Song Y, Lin D, Liu H. Clinical significance of PD-L1 expression in serum-derived exosomes in NSCLC patients. *J Transl Med*. 2019; 17:355

Lux A, Kahlert C, Grützmann R, Pilarsky C. c-Met and PD-L1 on Circulating Exosomes as Diagnostic and Prognostic Markers for Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019 ;20:3305.

Mathew M, Zade M, Mezghani N, Patel R, Wang Y, Momen-Heravi F Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cancer Immunotherapy.. *Cancers (Basel).* 2020; 12:2825.

Niu M, Yi M, Li N, Luo S, Wu K. Predictive biomarkers of anti-PD-1/PD-L1 therapy in NSCLC. *Exp Hematol Oncol.* 2021; 10:18

Osinaga, E., Bay, S., Tello, D., Babino, A., Pritsch, O., Assemet, K., Cantacuzene, D., Nakada, H. and Alzari, P. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. *FEBS Letters* 2000; 469:24-28

Oya K, Nakamura Y, Shen LT, Ishizuki S, Matsusaka S, Fujisawa Y. Soluble PD-L1 predicts tumor response and immune-related adverse events in patients with advanced melanoma treated with anti-PD-1 antibodies. *J Dermatol.* 2024;51:807-815. doi: 10.1111/1346-8138.17183

Pinzani P, D'Argenio V, Del Re M, Pellegrini C, Cucchiara F, Salvianti F, Galbiati S Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clin Chem Lab Med.* 2021 doi: 10.1515/cclm-2020-1685

Qu J, Mei Q, Liu L, Cheng T, Wang P, Chen L, Zhou J. The progress and challenge of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in treating non-small cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2021; 13:1758835921992968.

Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 2018; 359:1350–5

Ricklefs FL, Alayo Q, Krenzlin H, Mahmoud AB, Speranza MC, Nakashima H, Hayes JL, Lee K, Balaj L, Passaro C, Rooj AK, Krasemann S, Carter BS, Chen CC, Steed T, Treiber J, Rodig S, Yang K, Nakano I, Lee H, Weissleder R, Breakefield XO, Godlewski J, Westphal M, Lamszus K, Freeman GJ, Bronisz A, Lawler SE, Chiocca EA. Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Sci Adv.* 2018; 4:ear2766

Saxena P, Singh PK, Malik PS, Singh N. Immunotherapy Alone or in Combination with Chemotherapy as First-Line Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2020; 21:69.

Scirocchi F, Strigari L, Di Filippo A, Napoletano C, Pace A, Rahimi H, Botticelli A, Rughetti A, Nuti M, Zizzari IG. Soluble PD-L1 as a Prognostic Factor for Immunotherapy Treatment in Solid Tumors: Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2022;23:14496. doi: 10.3390/ijms232214496

Shin K, Kim J, Park SJ, Lee MA, Park JM, Choi MG, Kang D, Song KY, Lee HH, Seo HS, Lee SH, Kim B, Kim O, Park J, Kang N, Kim IH. Prognostic value of soluble PD-L1 and exosomal PD-L1 in advanced gastric cancer patients receiving systemic chemotherapy. *Sci Rep.* 2023; 13:6952. doi: 10.1038/s41598-023-33128-9.

Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018; 48:434-452.

Széles Á, Fazekas T, Váncsa S, Váradi M, Kovács PT, Krafft U, Grünwald V, Hadaschik B, Csizmarik A, Hegyi P, Váradi A, Nyirády P, Szarvas T. Pre-treatment soluble PD-L1 as a predictor of overall survival for immune checkpoint inhibitor therapy: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Immunol Immunother.* 2023; 72:1061-1073. doi: 10.1007/s00262-022-03328-9.

Tang Y, Zhang P, Wang Y, Wang J, Su M, Wang Y, Zhou L, Zhou J, Xiong W, Zeng Z, Zhou Y, Nie S, Liao Q. The Biogenesis, Biology, and Clinical Significance of Exosomal PD-L1 in Cancer. *Front Immunol.* 2020; 11:604

Theodoraki MN, Yerneni S, Gooding WE, Ohr J, Clump DA, Bauman JE, Ferris RL, Whiteside TL. Circulating exosomes measure responses to therapy in head and neck cancer patients treated with cetuximab, ipilimumab, and IMRT. *Oncoimmunology.* 2019; 8:1593805

Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical Significance of PD-L1+ Exosomes in Plasma of Head and Neck Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2018; 24:896-905

Urabe F, Kosaka N, Ito K, Kimura T, Egawa S, Ochiya T. Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020; 318:C29-C39.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018; 19:213-228

Wang J, Zeng H, Zhang H, Han Y. The role of exosomal PD-L1 in tumor immunotherapy. *Transl Oncol*. 2021; 14:101047

Weiss SA, Sznol M. Resistance mechanisms to checkpoint inhibitors. *Curr Opin Immunol*. 2021; 69:47-55.

Yang Y, Li CW, Chan LC, Wei Y, Hsu JM, Xia W, Cha JH, Hou J, Hsu JL, Sun L, Hung MC. Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Res*. 2018; 28:862-864

Yi M, Xu L, Jiao Y, Luo S, Li A, Wu K. The role of cancer-derived microRNAs in cancer immune escape. *J Hematol Oncol*. 2020; 13:25

Yin Z, Yu M, Ma T, Zhang C, Huang S, Karimzadeh MR, Momtazi-Borojeni AA, Chen S. Mechanisms underlying low-clinical responses to PD-1/PD-L1 blocking antibodies in immunotherapy of cancer: a key role of exosomal PD-L1. *J Immunother Cancer*. 2021; 9:e001698.

Zhang N, Chang J, Liu P, Tian X, Yu J. Prognostic significance of programmed cell death ligand 1 blood markers in non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Front Immunol*. 2024; 15:1400262. doi: 10.3389/fimmu.2024.1400262

Zhang L, Yu D. Exosomes in cancer development, metastasis, and immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; 1871:455–68

Zhou K, Guo S, Li F, Sun Q, Liang G. Exosomal PD-L1: New Insights Into Tumor Immune Escape Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:569219.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

