

**EXTRUSOMAS DE CÉLULAS NATURAL KILLER: VESÍCULAS
ARTIFICIALES DERIVADAS DE CÉLULAS COMO UNA ALTERNATIVA
INNOVADORA DE ENCAPSULAMIENTO DE FÁRMACOS PARA EL
CÁNCER DE PULMÓN.**

POR: JAVIERA VALENTINA CARRASCO ROJAS

**Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo
para optar al grado de Doctor en Ciencias e Innovación en Medicina**

Profesores guía:

Dra. Christina Schuh

Dr. José Antonio Jara Sandoval

Septiembre 2024

Santiago - Chile

© Javiera Valentina Carrasco Rojas, 2024.

Algunos derechos reservados. Esta obra está bajo **Licencia Creative Commons. Atribución-NoComercial-Chile.**

DEDICATORIA

Este trabajo es completamente dedicado a la persona más importante de mi vida, a mi hermosa y valiente madre Marcela, la responsable de que cada día me esfuerce en ser mejor persona, la que me ha enseñado a caminar y dar mis primeros pasos en este mundo tomadas de la mano y la que me ha enseñado que a veces los roles se invierten y es una la que tiene que tomarle la mano y ayudarla a caminar en este mundo.....

AGRADECIMIENTOS

Faltan palabras y hojas para agradecer a todas las personas que ayudaron de una u otra forma para que este trabajo se llevara a cabo.

Para comenzar, agradezco a la Dra. Christina Schuh y al Dr. José Antonio Jara por el cariño, paciencia, incondicionalidad y apoyo emocional que me brindaron en todo este camino y que culmina con este trabajo. Sin ellos, no habría nada de lo aquí escrito.

Agradezco al Centro de Medicina Regenerativa (CMR), que me acogió desde que comencé, estos 4 años y bonus track. En especial a los integrantes del grupo de la Dra. Schuh a lo largo de estos años, Pamina, Orlando, Simón, Gabriela y Rafael. A los integrantes que pasaron y que se mantienen, hicieron sin duda que se sintiera llegar a casa cada día y hacer más llevadero los momentos en donde los experimentos no funcionaron. En especial a la Sra. Silvia por ayudarme siempre que necesite ocupar la sala de cultivo de las primeras y a mis secuaces Barbarita, Nico, Javi G y Verito.

Agradezco a todos mis amigos que la ciencia y la vida me ha dado, en especial a Amanda Cortes, Yanara Vargas, Muriel Núñez, Claudio Moreno, Justine Castañeda, Kevin Muñoz, Liliana Godoy y David Pávez.

A mi compañero de generación, Juan Carlos Rubilar, por el cariño y compañerismo desde el comienzo.

Y finalmente, y para mí más importante, a mi familia, mis padres, hermano, tía, abuela, mi compañero de vida Felipe y mi hijo gatuno, mi tito.

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID) de Chile bajo el esquema de financiamiento independiente FONDECYT regular (#1220803). Fondo interno independiente de la Universidad del Desarrollo (concurso interno UDD CI2023). European Molecular Biology Organization (EMBO) Scientific Exchange Grant 10294. Becas de Doctorado Nacional, ANID (21200483) y Convenio Beca UDD - Programa de Doctorado “Ciencia e Innovación en Medicina” de la Universidad del Desarrollo. Los análisis proteómicos basados en espectrometría de masas fueron realizados por el Proteomics Core Facility, Departamento de Inmunología, Universidad de Oslo/Hospital Universitario de Oslo, el cual es apoyado por el programa de Core Facilities de la Autoridad Regional de Salud del Sureste de Noruega. Esta instalación también es miembro de la Red Nacional de Infraestructura de Proteómica Avanzada (NAPI), financiada por el programa INFRASTRUKTUR del Consejo de Investigación de Noruega (número de proyecto: 295910).

El resumen gráfico y las Figuras de introducción fueron creados con BioRender, y la licencia para su publicación fue adquirida por la Dra. Christina Schuh.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	X
ABREVIACIONES	XIV
RESUMEN	XVIII
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer de pulmón	1
Clasificación	3
2.1. Tratamientos	9
1.2.1. Terapias clásicas	10
1.2.2. Inmunoterapia	17
1.2.3. Terapia celular con células Natural Killer	20
Vesículas extracelulares	24
1.3.1. VEs en cáncer	29
1.3.2. VEs derivadas de células inmunes	31
Extrusomas – Vesículas artificiales derivadas de células	33
FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36
Hipótesis	36
a. Objetivo General	36
b. Objetivos Específicos	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Aislamiento de vesículas extracelulares de NK y extrusomas	38
3.1.1. Aislamiento de vesículas extracelulares	38
3.2. Generación de extrusomas NK	39
3.3. Caracterización de vesículas extracelulares y extrusomas	39
3.3.1. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA)	39
3.4. Potencial Zeta	41

3.5. Cuantificación de Proteínas	41
3.6. Cuantificación de Fosfolípidos	42
3.7. Análisis por Western Blot de los marcadores exosomales y de células NK	43
3.8. Determinación del encapsulamiento de docetaxel.....	44
3.9. Análisis Proteómico	45
3.10. Condiciones de cultivo celular para líneas celulares de cáncer de pulmón	48
3.11. Marcaje fluorescente de EVs, EXTs y EXT-DTXs	49
3.12. Visualización de la captación de vesículas con microscopía confocal	49
3.13. Ensayo de inhibición de la captación.....	50
3.14. Efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs.....	51
3.14.1. Ensayo de MTT.....	51
3.14.2. Apoptosis celular	52
3.15. Análisis estadístico	53
3.16. Metodología de experimentos adicionales.	54
3.16.1. Incorporación de cisplatino	54
3.16.2. Diferenciación de monocitos a macrófagos fenotipo M1.....	54
3.16.3. Fenotipificación de macrófagos M0 y M1 por ELISA	55
3.16.4. Aislamiento de EVs derivadas de macrófagos M1	56
3.16.5. Determinación del encapsulamiento de docetaxel de manera indirecta en EVs-M1	57
3.17. Cultivos en esferoides (3D)	58
RESULTADOS.....	59
4.1. Caracterización Extrusomas NK	59
4.1.1. Caracterización morfológica	59
4.1.2. Cuantificación, perfiles de distribución de tamaño y rendimientos	63
4.1.3. Caracterización molecular de marcadores	68
4.1.4. Estabilidad coloidal.....	70
4.1.5. Composición fosfolipídica.....	70
4.1.6. Determinación Encapsulamiento de Docetaxel	71

4.1.7. Análisis proteómico	74
4.2. Interacción Extrusomas de NK y células de carcinoma pulmonar	86
4.2.1. Internalización	86
4.2.2. Mecanismos de internalización	86
4.3. Efectos citotóxicos	91
4.3.1. Viabilidad celular	91
4.3.2. Inducción de apoptosis.....	94
4.4. Cisplatino como otra alternativa de encapsulamiento farmacológico ..	97
4.4.1. Efectos citotóxicos e identificación de encapsulamiento	97
4.5. Caracterización EXT de macrófagos con polarización a fenotipo M1	100
4.5.1. Caracterización fenotipo M1	100
4.5.2. Caracterización morfológica	102
4.5.3. Cuantificación, perfiles de distribución de tamaño y rendimientos.	103
4.5.4. Determinación Encapsulamiento de Docetaxel	105
4.5.5. Mecanismos de internalización de Extrusomas de macrófagos M1	107
4.5.6. Efectos citotóxicos.....	109
4.6. Proyecciones en aplicación de tratamientos a cultivos esferoidales..	111
4.6.1. Estandarización de condiciones para cultivos 3D de carcinoma pulmonar.....	111
DISCUSIÓN	118
CONCLUSIONES	134
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137
ANEXOS.....	161

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subcategorías de los parámetros T, N y M. Fuente: Tabla 3 de Detterbeck y cols[13] (modificado).....	161
Tabla 2. Clasificación de subgrupos de estadios del cáncer de pulmón. Fuente: Tabla 5 de Detterbeck y cols[13] (modificado).....	163
Tabla 3. Especificaciones de los anticuerpos y detalles de las condiciones para el análisis por Western Blot.	164
Tabla 4. Líneas celulares y medios de cultivo.	46
Tabla 5. Clasificación histológica y mutaciones claves de los cultivos de cáncer de pulmón.	46
Tabla 6. Genes y proteínas exclusivas de EVs, EXTs y DTX-EXTs no reportados en Vesiclepedia.	76

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Resumen gráfico de los objetivos del proyecto de tesis.	XX
Figura 2. Esquema Clasificación Histológica del Cáncer de Pulmón.	4
Figura 3. Estadios del Cáncer de Pulmón.	5
Figura 4. Mecanismos de Acción del Docetaxel.	12
Figura 5. Mecanismos de Acción del Cisplatino.	15
Figura 6. Clasificación de inmunoterapias	18
Figura 7. Efecto Antitumoral de células Natural Killer	21
Figura 8. Esquema ilustrativo de la interacción entre células Natural Killer y células de carcinoma pulmonar.	23
Figura 9. Esquema ilustrativo de la clasificación de vesículas extracelulares según su tamaño y biogénesis.	28
Figura 10. Representación esquemática de la comunicación mediada por vesículas extracelulares en el microambiente tumoral.	31
Figura 11. Esquema ilustrativo de la generación de extrusomas.	35
Figura 12. Caracterización morfológica de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivadas de células NK-92.	61
Figura 13. Análisis de topología y estructura de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivadas de células NK-92.	62
Figura 14. Análisis de perfiles de distribución poblacional y rendimiento de aislamiento de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. ...	67

Figura 15. Detección de marcadores proteicos en EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92.	69
Figura 16. Análisis de composición fosfolipídica y estabilidad coloidal de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92.	71
Figura 17. Encapsulación de docetaxel en extrusomas.....	73
Figura 18. Perfil proteómico comparativo de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92.	75
Figura 19. Comparación de perfiles proteómicos diferenciales de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92.	83
Figura 20. Análisis de proteínas diferencialmente expresadas identificadas en EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92.	85
Figura 21. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano.	89
Figura 22. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano.	91
Figura 23. Valores de IC50 de docetaxel a las 48 horas y efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano.	92
Figura 24. Selección representativa para el análisis de apoptosis.	95
Figura 25. Efectos citotóxicos y apoptóticos de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano.	96

Figura 26. Valores de IC₅₀ de cisplatino a las 48h y 72h en células de cáncer de pulmón humano y determinación de cisplatino por HPLC.....	99
Figura 27. Análisis de ELISA de la secreción de IL-1β, IL-6 y TNF-α en monocitos, macrófagos M0 y macrófagos con polarización M1.	101
Figura 28. Caracterización morfológica de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1.	102
Figura 29. Análisis de perfiles de distribución poblacional y rendimiento de aislamiento de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1.....	105
Figura 30. Porcentaje de eficiencia de encapsulación indirecta de docetaxel en DTX-EXTs-M1.....	106
Figura 31. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs del fenotipo M1 de macrófagos en células de cáncer de pulmón humano. ..	109
Figura 32. Efecto citotóxico de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1 en células de cáncer de pulmón humano.	111
Figura 33. Estandarización para la generación de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón.	113
Figura 34. Estandarización para la generación de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón.	115
Figura 35 Evaluación del crecimiento de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón.....	116

Figura 36. Evaluación del crecimiento de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón.....	117
--	------------

ABREVIACIONES

3D	Tridimensionales
ACDVs	Vesículas artificiales derivadas de células
ADN	Ácido dexosirribonucleico
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico.
ARN	Ácido ribonucleico
BRAF	Oncogén v-Raf viral del sarcoma murino homólogo B1
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T cells
CCP	Carcinoma de células pequeñas de pulmón
CD63	Grupo de diferenciación 63
CD9	Grupo de diferenciación 9
CIS	Cisplatino
CMVs	Cuerpos multivesiculares
CNCP	Carcinoma de pulmón de células no pequeñas
CP	Cáncer de Pulmón
CSC	Célula madre cancerosa
CSCs	Células madres cancerosas
DTX	Docetaxel
DTX-EXTs	Docetaxel-Extrusomas
DTX-EXTs-M1	Docetaxel-Extrusomas de macrófagos M1

EGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas
EML4	Proteína 4 similar a la asociada a microtúbulos de equinodermos
ESCRT	Complejo de Clasificación Endosomal Necesario para el Transporte
EVs	Extracellular vesicles
EVs-M1	Vesículas extracelulares de macrófagos M1
EXT	Extrusoma
EXTs	Extrusomas
EXTs-M1	Extrusomas de macrófagos M1
FasL	Fas ligando
FDR	Tasa de Falsos Descubrimientos
GAPDH	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IFN	Interferón
IL-10	Interleuquina 10

IL-1 β	Interleuquina 1 beta
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
ISEV	Sociedad internacional de vesículas extracelulares
KRAS	Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten
LAMP-1	Proteína de membrana asociada a lisosomas 1
LPS	Lipopolisacárido
M0	Macrofagos sin polarización de fenotipo
M1	Macrófagos con polarización a fenotipo M1
miRNA	MicroARN
NF- κ B	Factor nuclear kappa de cadena ligera de los linfocitos B activados
NK	Natural Killer
NKG2D	Receptor miembro D del grupo 2 de NK
NKp30	Receptor de citotoxicidad natural 3
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
Poli-(HEMA)	poli(2-hidroxietil metacrilato)
RIPA	Buffer para ensayos de inmunoprecipitación radioactiva
ROS1	Receptor de oncogén de supervivencia 1

sEVs	Small extracellular vesicles
TAMs	Macrofagis asociados a tumores
TCA	Transferencia celular adoptiva
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSG101	Gen de susceptibilidad tumoral 101
VEs	Vesículas extracelulares
VILs	Vesículas intraluminales

RESUMEN

El cáncer de pulmón (CP) tiene la tasa de mortalidad más alta a nivel mundial. Su patogénesis es multifactorial y, aunque se recomiendan terapias dirigidas, muchos pacientes deben depender de tratamientos clásicos (por ejemplo, quimioterapia), los cuales presentan limitaciones (efectos adversos, resistencias al tratamiento, entre otros). Los extrusomas (EXT), o vesículas derivadas artificialmente de células (ACDVs), han surgido como una herramienta prometedora para superar las barreras de la traslación hacia la clínica que presentan actualmente los tratamientos acelulares basados en vesículas.

Este estudio propone la generación de EXTs encapsulados con docetaxel (DTX) a partir de células Natural Killer (NK) humanas (DTX-EXTs) y evaluar su internalización en células de CP y su efecto citotóxico. También se realizaron análisis preliminares utilizando macrófagos polarizados a fenotipo M1 (EXTs-M1) para validar este método como una estrategia prometedora en la producción de ACDVs para la liberación de fármacos en el tratamiento del CP.

Los EXTs se generaron por extrusión celular y se evaluaron su morfología, estabilidad y composición. Se midió su efecto citotóxico en células de cáncer de pulmón, y se investigaron los mecanismos de captación celular mediante inhibidores de diferentes vías de endocitosis.

Los EXTs-NK y EXTs-M1 mostraron una morfología en forma de copa (tamaño medio <200 nm), los EXTs-NK tuvieron composición estable y su análisis

proteómico reveló proteínas presentes de manera diferencial asociadas con las características de las vesículas extracelulares (EV) y los marcadores de células NK, además de un patrón de enriquecimiento proteico distintivo. Se observó un efecto citotóxico significativo con los tratamientos EXT-DTX en comparación con los EXTs y EVs en ambas líneas celulares, con mayor eficacia en las células A549; la inducción de apoptosis corroboró estos hallazgos. Los estudios de internalización identificaron una localización perinuclear y la participación de la endocitosis mediada por clatrina como mecanismo principal en todos los grupos de vesículas.

Similar fueron los hallazgos obtenidos para los EXTs-M1, en donde los DTX-EXTs-M1 fueron más eficaces en la reducción de la viabilidad celular en las líneas de CP H1975 y H1299. Asimismo, se identificó preliminarmente, la endocitosis mediada por clatrina como principal mecanismo de internalización en células H1975.

En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que el uso de EXTs derivados de células inmunes, ofrece un enfoque prometedor para mejorar la entrega de quimioterapéuticos como el DTX, permitiendo reducir las dosis necesarias y, en consecuencia, minimizar los efectos adversos, lo que podría traducirse en una mejora en la calidad de vida de los pacientes con CP.

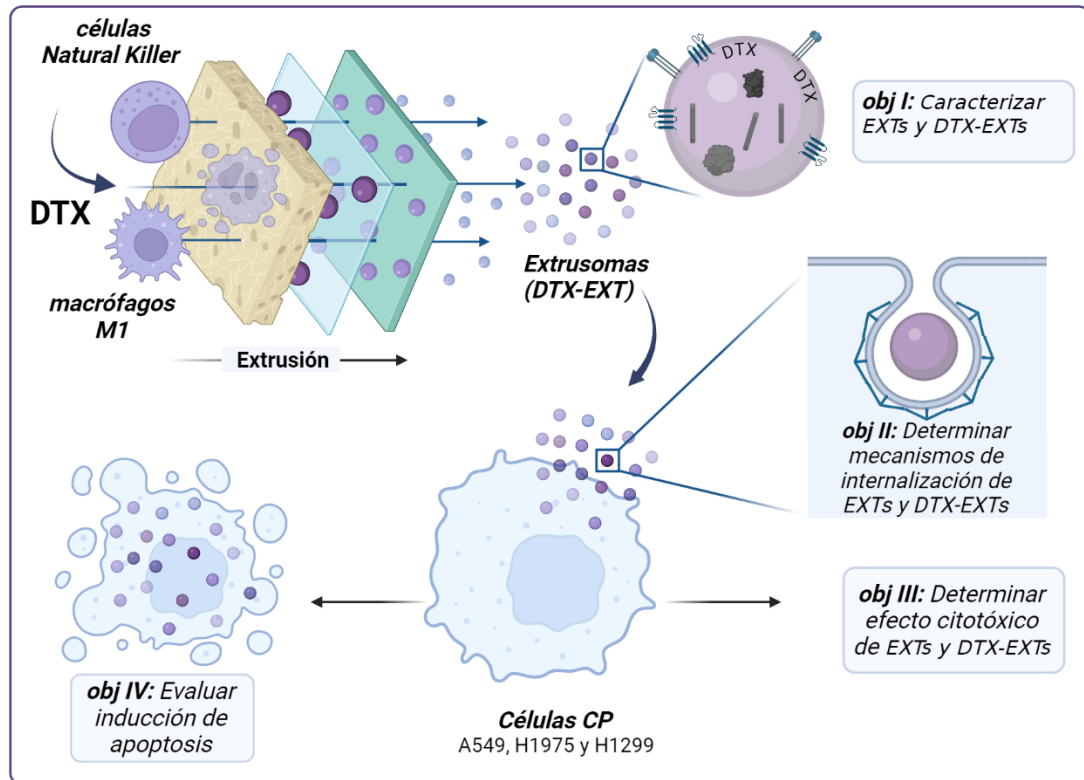


Figura 1. Resumen gráfico de los objetivos del proyecto de tesis.

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de pulmón

El cáncer representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con un impacto significativo en la salud pública, la economía y la sociedad. Según el último reporte del observatorio global del cáncer, correspondiente al año 2022, esta enfermedad es responsable del 16.8% de las defunciones a nivel global y constituye una de las tres principales causas de muerte en la población entre 30 y 69 años[1].

Específicamente el cáncer de pulmón (CP) sigue siendo un desafío importante para la salud mundial, ya que es una de las principales causas de mortalidad por cáncer. Según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, en 2020 se reportaron aproximadamente 2.2 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón y 1.8 millones de muertes, lo que lo convierte en el cáncer más letal[2]. El CP a nivel mundial presenta una tasa de incidencia ajustada de 22.4 por cada 100.000 personas, pero es el cáncer que tiene la mayor tasa de mortalidad ajustada (18 muertes por cada 100.000 personas), por año en ambos sexos[3]. CP es más frecuente en hombres que en mujeres, aunque la incidencia en

mujeres ha ido en aumento debido al aumento del tabaquismo. La mayor carga de esta enfermedad se encuentra en los países de ingresos bajos y medios, donde el control del tabaco es menos efectivo y las políticas de salud pública son limitadas[4].

En Chile, el CP también representa una preocupación significativa de salud pública, siendo el problema AUGE N°81 en personas de 15 años y más[4,5]. De acuerdo a datos del año 2022, el CP se encuentra en el quinto lugar con mayor incidencia (12.7 por cada 100.000 personas) dentro de todos los cánceres y es el segundo cáncer con mayor mortalidad (11.3 muertes por cada 100.000 personas) en la población[3]. Un análisis epidemiológico mas profundo, indican que la mortalidad se incrementa significativamente con la edad, siendo los mayores de 75 años el grupo más vulnerable. Los hombres presentan un riesgo de fallecimiento 1.81 veces mayor que las mujeres, una diferencia que se mantiene constante a lo largo de los años 2010-2018, y solo las mujeres experimentaron un aumento gradual en sus tasas de mortalidad[6].

Aunque la patogénesis del CP es multifactorial, tradicionalmente se ha considerado el consumo y exposición al tabaco como el principal factor de riesgo, y en efecto, más del 80% de los pacientes con CP son fumadores[7]. El riesgo de desarrollar CP en personas que no fuman pero que conviven con fumadores es un 24% mayor[8]. Además, se han descrito otros factores de riesgo, tales

como, las exposiciones ambientales a elementos como el uranio, radio, radón y la polución del aire, entre otros. También las exposiciones ocupacionales como los subproductos de la combustión de biomasa, la exposición a asbestos, además de los factores genéticos[7].

Aunque las políticas de control del tabaco en Chile y en el continente, han comenzado a mostrar un impacto positivo[9], el envejecimiento de la población y la exposición a otros factores de riesgo continúan siendo desafíos.

1.1.1. Clasificación

El CP se inicia cuando células sanas de los pulmones, especialmente las que recubren los bronquios (epitelio bronquial), adquieren mutaciones genéticas debido a factores ambientales, como el tabaco. Estas mutaciones alteran el funcionamiento normal de las células, haciendo que se multipliquen de manera descontrolada y formen tumores. Con el tiempo, estos tumores pueden invadir otros tejidos pulmonares y diseminarse a otras partes del cuerpo[10,11].

El CP por definición es una enfermedad heterogénea, de acuerdo con su clasificación histopatológica abarca varios subtipos. Existen dos grandes grupos de CP de acuerdo a su clasificación histológica: el carcinoma de células pequeñas de pulmón (CCP) (10-15% de los casos) y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CNCP) (80-85% de los casos). El CNCP se subdivide a su

vez en tres grupos: i) adenocarcinoma (38.5%) ii) carcinoma de células escamosas (20%); y iii) carcinoma de pulmón de células grandes (2.9%)(Figura 1)[12,13].

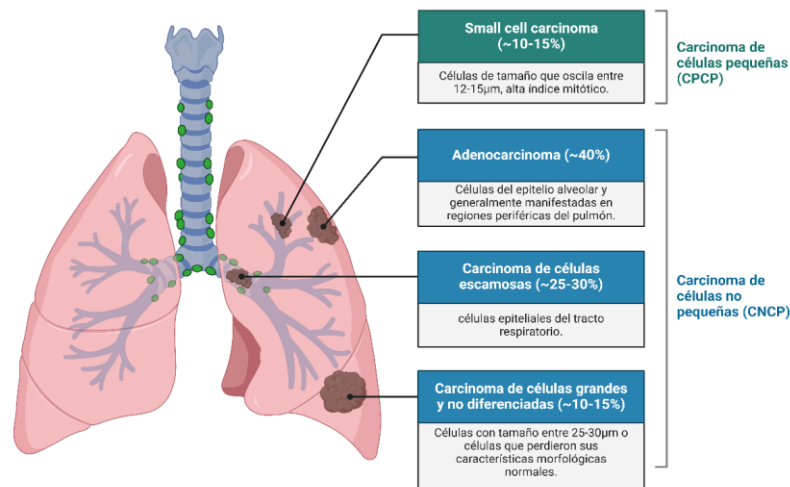


Figura 2. Esquema Clasificación Histológica del Cáncer de Pulmón. Diagrama esquemático que muestra las dos principales categorías de cáncer de pulmón: Cáncer de Pulmón de Células No Pequeñas (CNCP) y Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas (CPCP).

En conjunto a la clasificación histológica, también se realiza una clasificación anatómica para establecer la extensión que abarca el cáncer en el paciente, para ello la clasificación estándar internacional es la clasificación “TNM”: Tumor primario (sitio), Nódulos linfáticos regionales involucrados y Metástasis[13]. Asimismo, cada una de estas categorías presenta subclasificaciones y es el

conjunto de la combinación específica de estas tres categorías las que indica cuál de las cuatro etapas o estadios del CP manifiesta el paciente (Figura 3; Tabla 3; Tabla 4)[13].

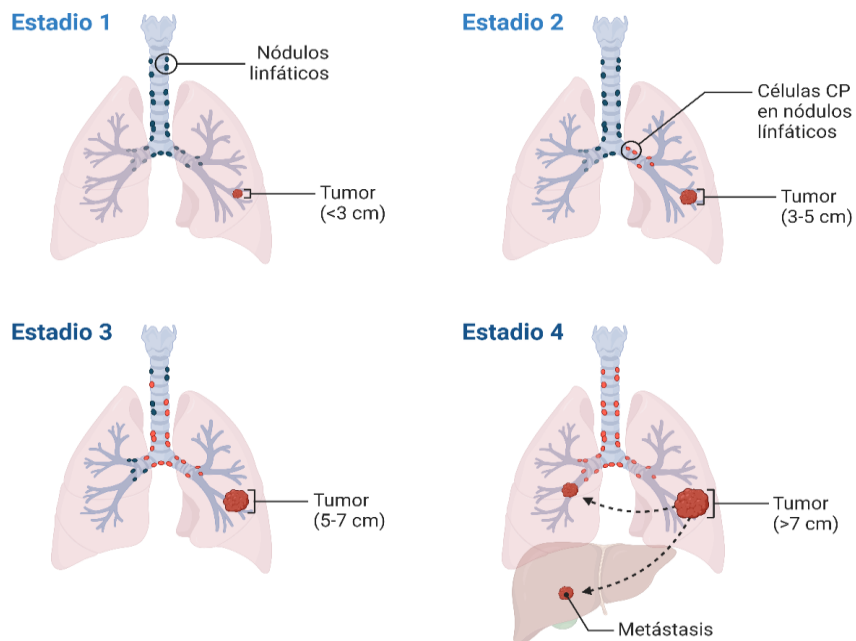


Figura 3. Estadios del Cáncer de Pulmón. Esquema que ilustra los cuatro estadios del cáncer de pulmón.

Adicionalmente, otro factor a considerar dentro de la complejidad de la clasificación de CP es la heterogeneidad intratumoral. Dentro de la composición del tumor, se identifica un subgrupo llamado “células madres cancerosas” (*cancer stem cell* (CSCs) del inglés), que son las más tumorigénicas[14]. Estas células

son capaces de autorrenovarse y no perder sus capacidades proliferativas en cada división celular, además de participar en procesos claves como la iniciación, progresión y metástasis, lo que las hace únicas. De hecho, se ha descrito [15] que la presencia de CSCs tras los tratamientos de quimio y/o radioterapia en pacientes con cáncer de ovario[16], mama[15], CP[17], entre otros, podría ser la causa de la alta tasa de reincidencia de esta patología con un fenotipo resistente[16].

De acuerdo con esto, las investigaciones del desarrollo de nuevos tratamientos apunten directamente a la erradicación de esta subpoblación para mejorar la eficacia terapéutica y reducir las tasas de reincidencia. Esto incluye enfoques como inhibidores de señales específicas de las CSCs, además del resto de las de la población tumoral.

En el CNCP se han descrito diversas inestabilidades genómicas o mutaciones, estas afectan principalmente a genes supresores de tumores y oncogenes, dentro de los cuales se destacan las alteraciones presentes en los genes de Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten (KRAS; 29.1-29.9%), Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR; 14.2-30.3%), Oncogén v-Raf viral del sarcoma murino homólogo B1 (BRAF; 7.2-5.5), quinasa de linfoma anaplásico (ALK; 0.8-4.4%) y el receptor de oncogén de supervivencia 1 (ROS1; 0.9-1.9%). Además, la frecuencia de estas alteraciones determina si el tumor se

encuentra en etapas tempranas del desarrollo tumoral o en etapa metastásica[18].

Las mutaciones más comunes en el gen KRAS suelen ocurrir en el codón 12 (G12C, G12D, G12V), pero también pueden afectar los codones 13 y 61. La consecuencia de estas mutaciones son que activan de manera constitutiva la vía de señalización de KRAS, promoviendo la proliferación celular descontrolada, resistencia a la apoptosis y una mayor capacidad invasiva, lo que se traduce con un pronóstico desfavorable, la resistencia a las terapias dirigidas convencionales y una limitada respuesta a la quimioterapia tradicional[19].

En EGFR, las mutaciones que presenta generalmente ocurren en el exón 19 (deleciones) o en el exón 21 (mutación L858R), lo que provoca la activación constitutiva del receptor y una señalización continua a través de la vía de señalización tirosina-quinasa. Las mutaciones activadoras en EGFR conducen a la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, angiogénesis y la capacidad de invasión tumoral[20].

Por otro lado, la mutación más común en BRAF es la V600E, que resulta en una activación continua e independiente de señales extracelulares, lo que promueve la proliferación celular y resistencia a la apoptosis. Adicionalmente, existen otras mutaciones no-V600E, como las V600K, G469A, K601E, entre otras, que

generan variabilidad en las señalizaciones involucradas en la promoción del crecimiento tumoral y que en conjunto pueden tener diferentes consecuencias biológicas y respuestas a los tratamientos[21].

En ALK, las alteraciones génicas más comunes son las translocaciones o fusiones, en las que el gen ALK se fusiona con otro gen, lo que lleva a la producción de una proteína quimérica que desencadena una señalización oncogénica constante. La fusión más común es EML4-ALK, donde ALK se une al gen EML4 (Proteína 4 similar a la asociada a microtúbulos de equinodermos). Esta fusión provoca una activación constitutiva de la actividad quinasa de ALK, lo que promueve la proliferación celular descontrolada, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis[22].

Finalmente, ROS1 por su parte, presenta fusiones génicas con otros genes, como CD74, SLC34A2 o TPM3, entre otros, generando quinasas de fusión oncogénicas que activan la proliferación celular de manera incontrolada. Las fusiones de ROS1 son muy similares en su mecanismo a las alteraciones observadas en ALK, ya que ambas activan vías de señalización clave como la PI3K/AKT, MAPK/ERK, y JAK/STAT, lo que conduce al crecimiento tumoral, supervivencia y, en muchos casos, resistencia a la apoptosis[23].

Todas estas alteraciones genéticas activan diversas vías de señalización que promueven el crecimiento, la proliferación y la supervivencia descontrolada de

las células tumorales, lo que contribuye significativamente a la progresión y agresividad de la enfermedad. Adicionalmente, cada una de estas alteraciones representa un blanco terapéutico específico para la generación de tratamientos personalizados, en función de las características moleculares del tumor de cada paciente[24].

1.2. Tratamientos

El tratamiento que debe recibir un paciente con CP dependerá de múltiples parámetros como el estado general de salud, tipo de CP, mutaciones presentes, tamaño de los tumores, locación de tumor/es y la etapa/estadio de CP. Por lo general, se recomienda la citorreducción para pacientes CNCP que se encuentren en estadios IA a IIB, sin embargo, menos del 20% del total de los casos de CP son candidatos a cirugía, ya que la mayoría de los pacientes al momento del diagnóstico presenta la enfermedad en etapas más avanzadas[25]. Otros tratamientos que pueden complementarse o no a la cirugía son la radioterapia, terapia dirigida (o terapias biológicas), inmunoterapia y quimioterapia. La Red Nacional Integral del Cáncer de EE.UU., describe de manera detallada los principales tratamientos, estas terapias se basan en la terapia dirigida como primera línea y/o combinación con quimioterapia[26]. En Chile la Guía de Práctica Clínica Cáncer de Pulmón del año 2018 detalla los

tratamientos que se recomiendan para cada tipo de CP de acuerdo con las características de los pacientes[27].

Sin embargo, no todos los pacientes cumplen con las condiciones necesarias para que las terapias dirigidas sean una opción, en tales casos es necesario recurrir a la quimioterapia como tratamiento neoadyuvante o adyuvante y en ocasiones en combinación con otras terapias. Dentro de los quimioterápicos más utilizados, se encuentran los que son en base a platino, estos tipos de fármacos son los que presentan mayor actividad anticancerígena[28].

1.2.1. Terapias clásicas

Los tratamientos clásicos para el CP suelen incluir cirugía, radioterapia y quimioterapia, cuya elección se basa en el tipo y estadio del tumor, y el estado de salud del paciente[29].

Se ha descrito que dentro de los quimioterápicos ampliamente utilizados en el CP se encuentra la familia de los taxanos, de la cual destaca el docetaxel (DTX), un fármaco altamente liposoluble. Se utiliza tanto en monoterapia como en combinación para el CP y otros cánceres como el de ovario, mama, próstata, gástrico, y el de cuello y cabeza[30–32].

Debido a la baja solubilidad del fármaco en agua, este debe administrarse en formulaciones con el surfactante no iónico polisorbato 80 o también llamado

Tween-80[33], agente solubilizante para mejorar la biodisponibilidad del DTX[34]. Debido al riesgo de reacciones alérgicas o hipersensibilidad al polisorbato 80, los pacientes suelen recibir premedicación con corticosteroides. Sin embargo, se ha descrito que el polisorbato 80 por si solo contribuye a la manifestación de reacciones de hipersensibilidad y efectos secundarios[34].

El tratamiento con DTX es recomendado para pacientes con CP ya sea local, avanzado o metastásico. Por lo general su administración se recomienda en pacientes que ya hayan presentado resistencia previa a los tratamientos con cisplatino (CIS) o carboplatino[35].

El DTX tiene múltiples blancos para ejercer su función antitumoral, el más reconocido es la inhibición de la proliferación mediante la estabilización del ensamblaje de los microtúbulos, inhibiendo la despolimerización, induciendo el arresto del ciclo celular en fase G1/M y con ello, la muerte celular[36]. El mecanismo principal de resistencia está dado por el aumento de la expresión y mutaciones en los genes que codifican para transportadores de eflujo de fármacos dependientes de ATP, tales como, ABCB4 y ABCC1[37]. Aunque también se ha descrito que en presencia del fármaco se inducen mutaciones en el gen de β -tubulina de la célula tumoral, induciendo la mayor expresión de otros isotipos de tubulina, como el III y IV, además de modificaciones postraduccionales en esta proteína. Todos estos mecanismos en conjunto

generan una pérdida de la afinidad del DTX por la tubulina, gatillando así la resistencia a este fármaco (Figura 4)[38].

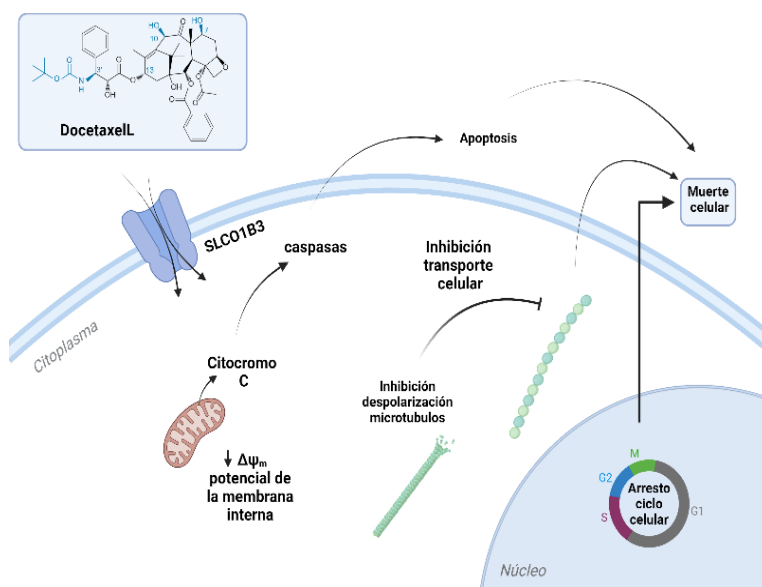


Figura 4. Mecanismos de Acción del Docetaxel. Esquema ilustrativo que muestra los principales mecanismos de acción del docetaxel.

La gran limitante del tratamiento con DTX es la baja solubilidad en agua que presenta el fármaco, por lo que se debe acompañar la formulación con surfactantes no iónicos que permitan aumentar su biodisponibilidad además de la generación de serios efectos adversos, como reacciones de hipersensibilidad, neutropenia, toxicidad musculoesquelética, neuropatía periférica y estenosis del conducto nasolagrimal, entre otros[39].

Se han descrito varios mecanismos que confieren resistencia al tratamiento con DTX. El principal mecanismo parece ser la actividad de transportadores de eflujo de fármacos dependientes de ATP, específicamente ABCB4 y ABCC1. Se ha informado que el aumento en la expresión y las mutaciones en las P-glicoproteínas presentes en estos transportadores están relacionadas con la resistencia al DTX[31,40]. Otro mecanismo clave son las mutaciones en los genes de la β -tubulina que ocurren en las células tumorales, así como la sobreexpresión de los isotipos III o IV de esta proteína. Estas alteraciones, en conjunto con las modificaciones postraduccionales, generan cambios en la polimerización de los microtúbulos, lo que contribuye a la resistencia al DTX[41]. Además, se ha descrito una relación en la resistencia al DTX relacionada con el receptor de andrógenos (RA), ya que la sobreexpresión de variantes del RA, como AR-v7, que son constitutivamente activas y promueven la progresión del cáncer al impulsar la transcripción de genes blancos del RA. Estas variantes no requieren la asistencia de microtúbulos para su translocación, lo que las hace independientes del efecto del DTX sobre la dinámica microtubular. Además, el aumento en la expresión del RA en células tumorales circulantes ha sido asociado con un peor pronóstico, sugiriendo que la señalización del RA juega un papel crítico en la resistencia al tratamiento con DTX[42]. Asimismo, la resistencia también puede deberse a la disminución en la entrega del fármaco ocasionada por la deficiente red vascular en los tumores, lo que limita la difusión y penetración

del DTX en toda la masa tumoral. En este contexto, el microambiente tumoral juega un papel crucial. Por lo general, estos microambientes son más ácidos debido a la acumulación de metabolitos, lo que dificulta la absorción del DTX por las células tumorales. Componentes como el estroma y las células tumorales pueden sobreexpresar y secretar factores de crecimiento y citoquinas, como interleuquina 6 (IL-6) y el factor nuclear kappa de cadena ligera de los linfocitos B activados (NF- κ B), promoviendo la resistencia al DTX[41].

Finalmente, un mecanismo importante es el desarrollo de CSC. Cuando las células tumorales se exponen al DTX, el ciclo celular puede detenerse sin inducir la muerte de toda la población tumoral. Debido a la heterogeneidad de las células cancerosas, una pequeña subpoblación altamente resistente sobrevive, se replica y expande, lo que agrava la resistencia al tratamiento[43].

Otros quimioterapéuticos de amplio uso son los en base a platino como el cisplatino (CIS), este fármaco se utiliza tanto en tratamientos para el CCP y el CNCP, además de otros tipos de cáncer como el de ovario, cerebro y mama[44]. Su efecto antitumoral se basa en su capacidad para reaccionar con el ADN e inducir la formación de aductos intracadena, específicamente, el CIS reacciona con el nitrógeno reactivo en posición 7 del heterociclo de las purinas y como consecuencia causa el daño en las moléculas de ADN lo que provoca la inhibición de la replicación y transcripción y dificulta enormemente todos los mecanismos

de reparación al ADN, por lo tanto se genera la inhibición de la división en las células tumorales e induce la apoptosis[28]. Esta capacidad es en mayor parte la responsable del efecto citotóxico del CIS, más que al daño generado en el ADN por la formación de aductos. Lamentablemente, la respuesta de los pacientes al tratamiento con CIS es variable y un factor crucial es la resistencia que desarrollan las células tumorales a este fármaco.

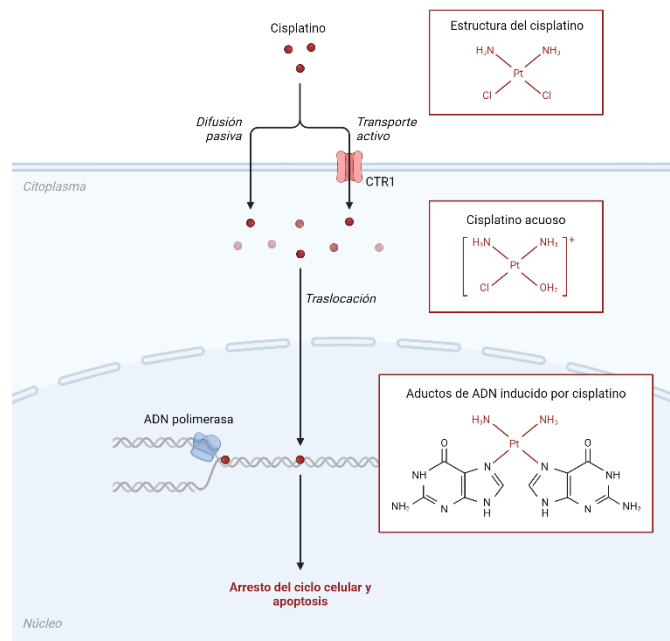


Figura 5. Mecanismos de Acción del Cisplatino. Esquema ilustrativo que muestra los principales mecanismos de acción del cisplatino.

Se han descrito distintos mecanismos que le confieren a la célula resistencia a CIS, uno de ellos, es la inducción de los transportadores de membrana de para

CIS a la degradación. CIS puede ingresar a las células a través de análogos a MDR1 como lo son ATPasas de eflujo (MRPs, ATP7A/B) y los importadores de solutos (CTR1, los SLCs, AQP2 y AQP9), de estos últimos se ha reportado que CIS induce la degradación del transportador de membrana de cobre (CTR1), lo que desencadena la disminución de la entrada del fármaco generando la resistencia[45].

Otros mecanismos descritos de resistencia a CIS son cambios epigenéticos en la célula tumoral que induzcan el secuestro/secreción activa de los compuestos de platino, disminuyendo la concentración del fármaco en el citoplasma. También las células son capaces de desintoxicarse gracias a la acción de conjugados de GSH, metalotioneínas y otros antioxidantes. Además de la sobreexpresión de microRNAs como miRNA1 y factores de transcripción[28]. Incluso se han reportado aumentos en los mecanismos de reparación del daño inducido por CIS al ADN como reparación por escisión de nucleótidos, siendo este último uno de los principales mecanismos de resistencia del CIS[46].

Sin embargo, la administración sistémica del CIS tiene como limitante la manifestación de efectos adversos. El CIS se conoce como uno de los quimioterapéuticos más eméticos, los pacientes también pueden manifestar ototoxicidad, neurotoxicidad, hemólisis y nefrotoxicidad, esta última es el efecto adverso que más limita la dosis a administrar[47].

A pesar de la potente capacidad antitumoral de estos fármacos que permite que se sigan utilizando hoy en día en el tratamiento de una gran variedad de cánceres, sus limitaciones como los efectos adversos y la generación de resistencia han impulsado la continua búsqueda de alternativas terapéuticas capaces de superar estos obstáculos.

1.2.2. Inmunoterapia

Uno de los tratamientos que se han desarrollado exponencialmente los últimos años ha sido la inmunoterapia[48]. Este tipo de tratamiento tiene como objetivo principal el aprovechar y potenciar el sistema inmunológico del paciente para combatir contra las células tumorales y, a diferencia de los tratamientos clásicos, que actúan directamente sobre estas células, la inmunoterapia busca activar o restaurar las células inmunes y sus funciones para lograr la identificación y eliminación de las células cancerígenas[49].

La clasificación tradicional de las inmunoterapias basada en sus mecanismos de acción, corresponde a dos grupos; i) pasivas, en donde se encuentran los tratamientos en base a anticuerpos monoclonales, transferencia celular adoptiva (TCA) y viroterapia oncolítica; mientras que en las ii) activas se encuentran la formulación de vacunas en base a ADN y ARN contra células tumorales, terapia

en base a células dendríticas, inhibidores de puntos de control inmunológico y citoquinas inmunoestimuladoras[50].

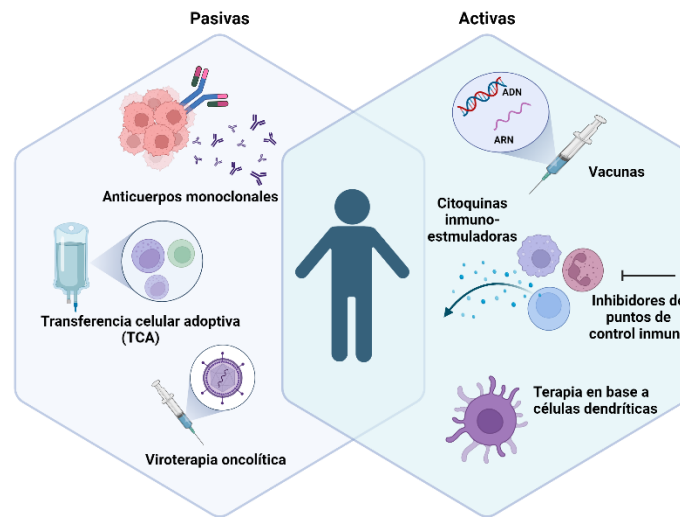


Figura 6. Clasificación de inmunoterapias: esquema representativo de inmunoterapias pasivas y activas.

En el contexto de CP, la inmunoterapia ha emergido como una opción prometedora, especialmente para los pacientes CNCP en etapas avanzadas o metastásicas. Las terapias inmunológicas más utilizadas incluyen los inhibidores de puntos de control inmunitario, tales como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 (programmed cell death protein 1), PD-L1 (programmed death-ligand 1) y CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4). Estos inhibidores funcionan al bloquear los mecanismos que las células cancerosas utilizan para evadir el sistema inmunológico, permitiendo así que las células T reconozcan y ataquen el tumor[51].

La transferencia celular adoptiva es una estrategia emergente que consiste en modificar y expandir células inmunes del paciente de manera ex vivo para luego amplificarlas modificando y mejorando su capacidad anticancerosa. Este enfoque personalizado ha mostrado resultados prometedores, especialmente en casos de cánceres que son resistentes a tratamientos convencionales[52].

Además, entre este tipo de terapias, se han destacado las basadas en linfocitos T, (CAR-T: Chimeric Antigen Receptor T cells), y la terapia con células NK (Natural Killer; descrito en más detalle en punto 1.2.3). En los últimos años, ha crecido el interés en utilizar monocitos y macrófagos debido a su capacidad intrínseca para modular la respuesta inmune y su rol en el microambiente tumoral[53]. En el microambiente tumoral, los macrófagos pueden adoptar un fenotipo M1 (proinflamatorios, antitumorales) o M2 (antiinflamatorios, asociados a la progresión tumoral), por lo que una de las estrategias innovadoras ha consistido en reprogramar o modificar macrófagos M2, transformándolos hacia un fenotipo más proinflamatorio (M1) para así poder gatillar mecanismos de reconocimiento selectivos contra las células tumorales[54,55].

La elección de la inmunoterapia depende de la expresión de biomarcadores específicos como del perfil genético del tumor, lo que permite una mayor personalización del tratamiento. Aunque la inmunoterapia no es efectiva para todos los pacientes y puede tener efectos secundarios significativos[56],

representa un avance importante hacia un tratamiento más dirigido y con un enfoque más integrado en contra el CP.

1.2.3. Terapia celular con células Natural Killer

Las células NK son linfocitos innatos esenciales en la defensa contra patógenos y células tumorales, participando en su eliminación y regulando la respuesta inmune[57]. Las células NK tienen la capacidad única de activación directa al encontrarse con células cancerosas, induciendo la muerte celular a través de gránulos citotóxicos o receptores de muerte[58–60].

Las células NK secretan citoquinas como interferón γ (IFN- γ) y factor tumoral de necrosis α (TNF- α), los cuales son cruciales para la activación de otras células inmunitarias, como la estimulación de la maduración de las células dendríticas, activación de linfocitos T citotóxicos y monocitos[61], y la regulación de la respuesta inmune a través de la activación de JAK1, JAK2 y STAT1, influyendo en la expresión génica relacionada con la inmunidad[62]. Además, las células NK responden a citoquinas como interleucina 2 (IL-2), las que son indispensables para la homeostasis inmunitaria, la capacidad de potenciar la actividad citotóxica y la funcionalidad prolongada de las células NK[63].

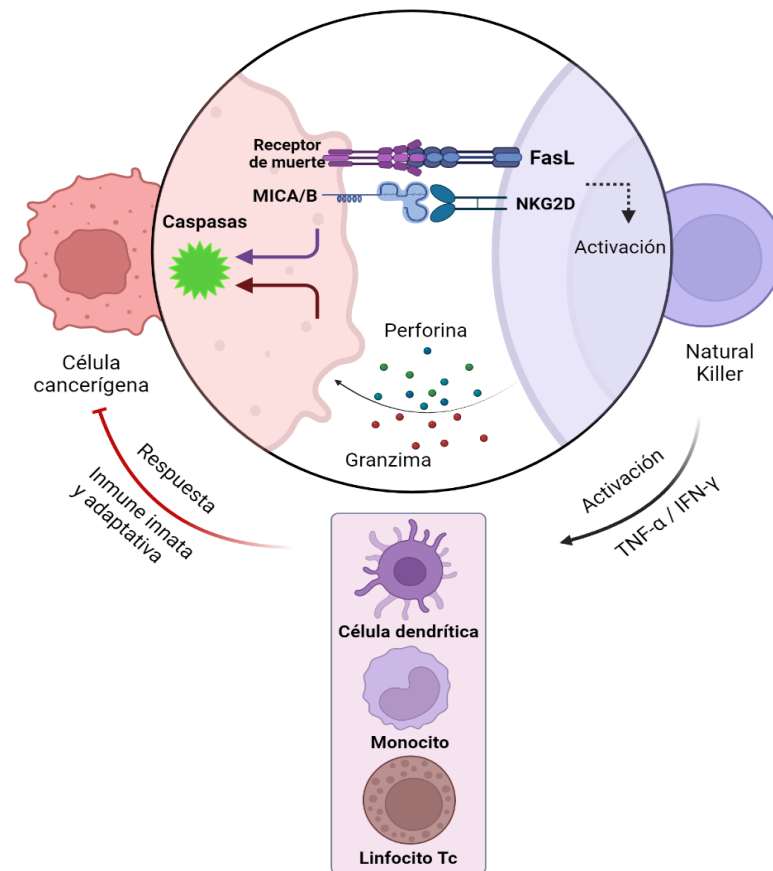


Figura 7. Efecto Antitumoral de células Natural Killer: Esquema mecanismos mediados por enzimas proteolíticas, receptores y activación de células inmunes.

La inmuno-vigilancia de las células NK en el contexto del cáncer es compleja, dado que las células tumorales pueden evadir la respuesta del sistema inmune a través de diversos mecanismos de escape inmunitario[64]. Varios estudios han demostrado que en muestras pulmonares de pacientes con CNCP que no han recibido tratamiento previo, las células tumorales son capaces de secretar citoquinas inmunosupresoras como interleuquina 10 (IL-10) y el factor de

Crecimiento Transformante Beta (TGF- β). Estas citoquinas tienen un efecto supresor sobre las funciones de las células NK infiltradas en el tumor[65]. Además, se ha investigado el papel específico de la secreción de TGF- β 1, demostrando que su presencia inhibe la actividad citotóxica antitumoral de las NK al disminuir la expresión de los receptores de citotoxicidad natural 3 (NKp30) y el receptor miembro D del grupo 2 de NK (NKG2D) en la superficie celular de las NK, receptores cruciales en la inmunidad tumoral[66].

No solo la expresión de receptores afecta las funciones de las NK. Hodge y colaboradores (2014) mostraron que en resecciones quirúrgicas de pulmón de pacientes con CNCP en estadios que iban desde IB hasta IIIA, las células NK infiltradas en el tumor presentan una disminución significativa en la producción de granzima B, perforina, IFN- γ y TNF- α en comparación con muestras de pacientes no diagnosticados con CP[67].

El rol de las células NK no se limita a la progresión tumoral; también hay evidencia clínica que indica que el número de células NK en sangre periférica después del tratamiento con inmunoterapia es un factor crucial para determinar quiénes tienen mayor probabilidad de remisión de la enfermedad. Se ha descrito una mayor probabilidad de remisión en pacientes con leucemia mieloide crónica que tienen un recuento elevado de NK en periferia (mayor a $162/\text{mm}^3$)[68].

Esta modulación directa de las señales entre las células NK y las células cancerosas también ocurre a través de mediadores como las vesículas extracelulares, lo que amplía la complejidad de la heterogeneidad tumoral y de los enfoques terapéuticos.

Adicionalmente, los TCA basados en células NK presentan desafíos como las dificultades de obtención y expansión *ex vivo*, el limitado tiempo de vida útil una vez transferidas al paciente, dificultades en la capacidad de expandirse y mantenerse activas en el organismo del paciente. Evasión del reconocimiento antigénico con las células tumorales, efecto inmunosupresor de las NK transferidas producto del microambiente tumoral, variabilidad de la respuesta del tratamiento, inmunogenicidad, entre otros parámetros[69–72].

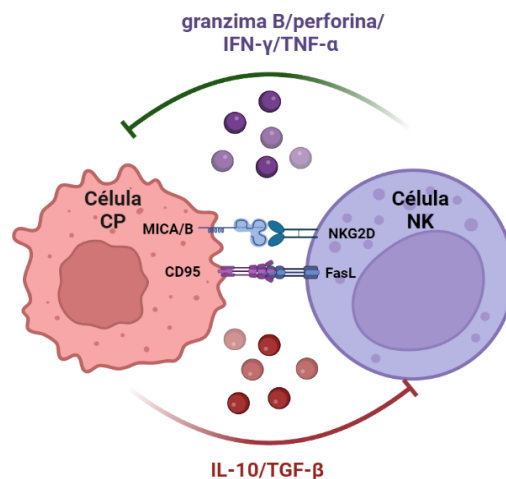


Figura 8. Esquema ilustrativo de la interacción entre células Natural Killer y células de carcinoma pulmonar.

1.3. Vesículas extracelulares

Esta modulación directa de las señales entre las células NK y las células tumorales también ocurre a través de mediadores como las vesículas extracelulares (VE), lo que amplía la complejidad de la heterogeneidad tumoral y de los enfoques terapéuticos[73].

Las VE son estructuras que presentan tamaños desde 30 nm hasta 5 μ m que las células secretan al espacio extracelular por múltiples tipos celulares como mecanismo homeostático y que juegan un papel clave en la comunicación intercelular. Estas vesículas transportan diversas biomoléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que les permite participar en la transferencia de información entre células cercanas o distantes como también de manera autocrina y están presentes en todos los fluidos biológicos[74].

Dependiendo de su tamaño y su mecanismo de biogénesis, estas se pueden clasificar principalmente en tres tipos: exosomas, microvesículas y vesículas apoptóticas[75].

Los exosomas, han sido el grupo de VEs más ampliamente investigados y su mecanismo de biogénesis comienza cuando estímulos como señalización de receptores de membranas, ubiquitinación de proteínas, entre otros, inducen la endocitosis de la membrana plasmática, formando endosomas tempranas que maduran a cuerpos multivesiculares (CMVs). Dentro de estos CMVs, se generan

vesículas intraluminales (VILs) mediante la invaginación de la membrana, regulada por el complejo ESCRT (Complejo de Clasificación Endosomal Necesario para el Transporte) o vías independientes de ceramidas. Durante este proceso, se clasifican biomoléculas específicas, como proteínas y ARN, que serán incluidas en el cargo de los exosomas. Los CMV pueden fusionarse con los lisosomas para degradar su contenido (reciclaje de moléculas) o con la membrana plasmática, liberando las VILs como exosomas al espacio extracelular[74,76].

Una vez secretados, el contenido de las vesículas puede liberarse de manera indirecta, a través de la difusión de señales solubles hacia la célula, o de manera directa mediante la internalización de la vesícula completa. Esta internalización se puede llevar a cabo mediante diversos mecanismos:

Fusión de membranas: En este proceso, la membrana de la vesícula se fusiona con la membrana plasmática de la célula, permitiendo que el contenido del exosoma se incorpore directamente al citoplasma[77].

Fagocitosis: Este mecanismo es principalmente realizado por células especializadas, como macrófagos y células dendríticas. La interacción entre los ligandos de las vesículas y receptores específicos, como los receptores del complemento o los receptores tipo Toll, induce la formación de pseudópodos a través de un mecanismo dependiente de actina. Esta interacción ligando-receptor facilita la internalización de la vesícula en fagosomas, los cuales pueden

fusionarse con lisosomas para degradar los componentes de la vesícula, permitiendo su reciclaje o presentación antigénica[78].

Macropinocitosis: En este caso, también se produce una interacción ligando-receptor, que puede ser mediada por células del sistema inmune y células epiteliales. Este proceso desencadena la prolongación de la membrana citoplasmática, formando "*ruffles*" que generan macropinosomas con la vesícula en su interior. Al igual que en el mecanismo anterior, se lleva a cabo la fusión del macropinosoma con el lisosoma para degradar y reciclar el contenido exosomal.[78]

Fusión Mediadas por Clatrina o Caveolas: En la endocitosis mediada por clatrina, la unión del ligando al receptor provoca la invaginación de la membrana, donde se reclutan proteínas de clatrina y adaptadoras que, junto con la membrana plasmática, recubren la vesícula para su internalización. En la endocitosis mediada por caveolas, se forman pequeñas invaginaciones en la membrana, ricas en fosfolípidos y colesterol, además de proteínas específicas como caveolinas. El ensamblaje de caveolinas permite la reorganización del citoesqueleto y la invaginación de la vesícula[78].

Endocitosis Mediadas por Receptores o Balsas Lipídicas: Este mecanismo requiere la presencia de un ligando en la superficie exosomal para captar receptores específicos en la membrana plasmática celular, o la existencia de microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos en la membrana plasmática,

que facilitan la invaginación de la membrana y la internalización de la vesícula[79].

El mecanismo de comunicación que utilice la vesícula con la célula resulta vital para poder definir el tipo de respuesta que o efecto que este mensaje tendrá en la célula, por ejemplo, definir si el contenido es trasladado solo a nivel citoplasmático o necesita de la traslocación al núcleo[80,81]. Adicionalmente, el mecanismo de internalización de una vesícula con la correspondiente célula receptora es específico y dependerá de las características de cada una de ellas[82], por ejemplo, las VE que no presentan la tetraspanina de grupo de diferenciación 63 (CD63) en su composición, son capaces de interaccionar exclusivamente con células dendríticas neuronales[83]. Mientras que la capacidad de internalización de vesículas también puede estar dado por el estado metabólico de la célula receptora[84,85].

En la actualidad, se ha reemplazado el uso del término exosomas por VE pequeñas (small EVs sEVs), ya que en la práctica, el aislamiento específico de este grupo de vesículas es complejo, por lo que se ha recomendado el uso del término de VEs pequeñas para vesículas con tamaños menores a 200 nm[86,87].

En condiciones fisiológicas, las VE participan en una variedad de procesos, como la modulación del sistema inmunológico, la reparación y homeostasis de tejidos, permitiendo la transferencia de señales moleculares como mecanismo de interacción entre diferentes tipos celulares[88].

En contextos patológicos, las VE juegan un papel importante en la progresión de diversas enfermedades, incluidas las inflamatorias, neurodegenerativas y cáncer, entre otras. En el cáncer, por ejemplo, las células tumorales secretan vesículas que pueden promover la invasión, la metástasis y la resistencia a terapias[88,89].

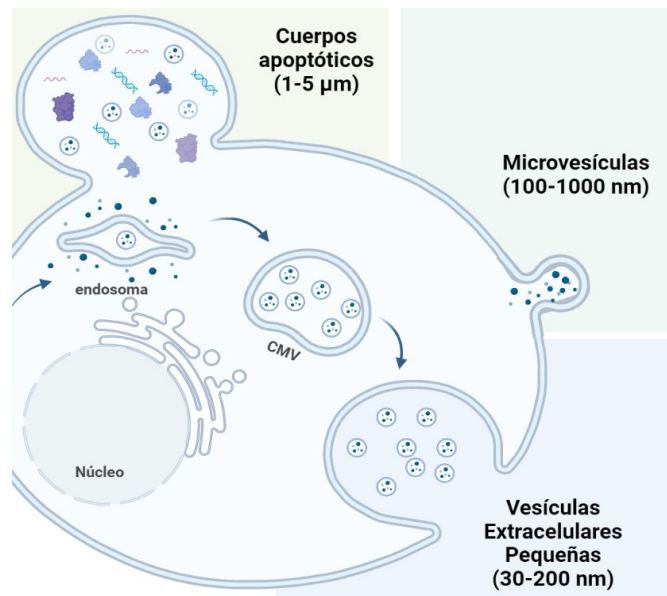


Figura 9. Esquema ilustrativo de la clasificación de vesículas extracelulares según su tamaño y biogénesis.

1.3.1. VEs en cáncer

En cáncer, la comunicación basada en VEs secretadas por las células tumorales y las del microambiente tumoral tienen un impacto significativo en la progresión tumoral, la angiogénesis, la evasión del sistema inmune y la resistencia a tratamientos[90].

Desde el punto de vista de la célula tumoral, las VEs que secretan pueden tener un efecto autocrino y paracrino, gatillando dos tipos de respuesta[91,92]. En primer lugar, las VEs con señalización autocrina pueden modular su comportamiento celular, aumentando su capacidad de proliferación, invasión, resistencia a la apoptosis y resistencia a tratamientos[91].

De manera paracrina, las VEs secretadas por células cancerígenas pueden afectar a diferentes células del microambiente tumoral, reprogramándose para que favorezcan la progresión tumoral, fomentando la angiogénesis, preparando nichos metastásicos y suprimiendo la respuesta inmune antitumoral[93]. Por ejemplo, las VEs pueden inducir a los fibroblastos a convertirse en fibroblastos asociados al cáncer (CAF), que a su vez secretan factores que promueven el crecimiento tumoral[94].

Adicionalmente, se puede realizar una señalización cruzada mediada por todas las VEs secretadas por las diferentes células que componen el microambiente tumoral, favoreciendo en general los procesos de progresión tumoral, metástasis y resistencia a tratamientos, lo que las convierte en importantes blancos terapéuticos en la investigación oncológica[95].

Estos blancos farmacológicos destacan el rol de las VEs como biomarcadores, ya que las VEs transportan un contenido representativo de su célula de origen, reflejando perfiles moleculares específicos del tumor. Además, su presencia en todos los fluidos biológicos las convierte en una fuente accesible para el análisis. Se ha observado que las células cancerosas secretan una mayor cantidad de VEs en comparación con las células normales, lo que refuerza su relevancia como indicadores de la actividad tumoral. Estas propiedades han impulsado investigaciones destinadas a su identificación, permitiendo su uso en la detección temprana, el pronóstico y el monitoreo del cáncer, con un enfoque especial en evaluar la respuesta a los tratamientos[96,97]. En CP por ejemplo, se ha reportado que fibronectina asociada a VEs tanto de líneas celulares como de plasma de pacientes, podría ser un potencial biomarcador de estadios tempranos y avanzados de CNCP[98].

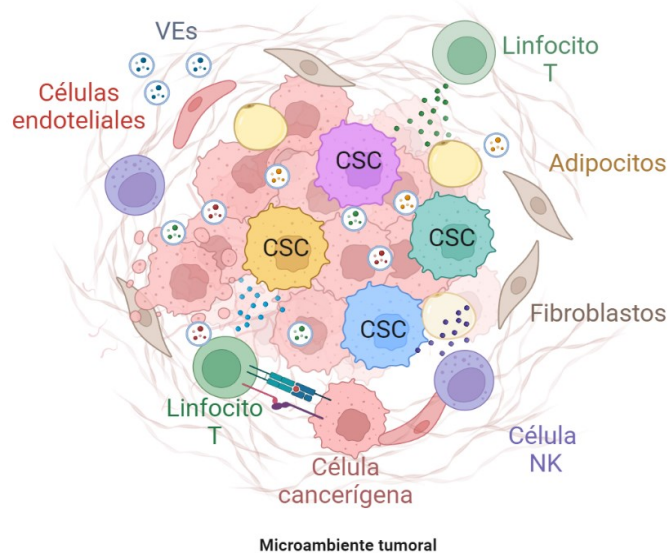


Figura 10. Representación esquemática de la comunicación mediada por vesículas extracelulares en el microambiente tumoral.

1.3.2. VEs derivadas de células inmunes.

Entre las células del sistema inmune que secretan VEs, los monocitos, macrófagos y células NK son de especial interés debido a su rol en la vigilancia inmunológica y en la interacción con las células tumorales[99].

Los monocitos y macrófagos, particularmente los macrófagos asociados a tumores (TAMs en inglés), secretan VEs que pueden tener efectos duales en el cáncer. Los TAMs suelen polarizarse hacia un fenotipo M2 como resultado de las

citoquinas secretadas por las células tumorales en el microambiente tumoral, favoreciendo la inmunosupresión, la angiogénesis y la progresión tumoral[100]. Las VEs secretadas por estos macrófagos contienen factores inmunosupresores, que facilitan la evasión inmune ya que se ha descrito que son capaces de suprimir la actividad de los linfocitos T, células dendríticas, entre otros[101]. Como también promueven el fenotipo de célula madre cancerosa (CSC del inglés)[102].

Las VEs derivadas de células NK por otro lado, tienen la función de eliminar las células tumorales. Las células NK al activarse con citoquinas, también son capaces de secretar grandes cantidades de VEs, las que se ha descrito que pueden ejercer una función antitumoral gracias a que contienen moléculas como perforina, granzima, Fas ligando (FasL), TNF- α y microRNAs (miRNA), que son esenciales para inducir la muerte celular y la eliminación efectiva de las células tumorales[103,104]. Un ejemplo de ello son los exosomas derivados de la línea celular NK-92, que contienen perforina y FasL, y se ha demostrado que también liberan TNF- α . Estas vesículas han mostrado un significativo efecto citotóxico y un potencial rol antitumoral, especialmente en células de melanoma, donde han sido capaces de inducir su muerte celular[105].

Sin embargo, en ciertos contextos, las células tumorales pueden modificar el contenido de las VEs derivadas de células NK para evitar su actividad citotóxica,

lo que subraya la complejidad de la interacción entre las VEs del sistema inmunológico y el cáncer. Por ejemplo, se ha observado que las VEs secretadas por carcinomas pancreáticos pueden reducir la expresión de importantes proteínas de membrana en las células NK, como NKG2D y la proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP-1), que son fundamentales para su actividad citotóxica[105].

Sin embargo, los desafíos para la traslación clínica que presentan las terapias en base a VEs están relacionadas a la diversidad de rendimientos de aislación, dificultades de producción en masa, alta heterogeneidad en su composición, seguridad e inmunogenicidad, por lo que se hace indispensable buscar estrategias que superen estas limitaciones[106,107].

1.3.3. Extrusomas – Vesículas artificiales derivadas de células

Como una nueva alternativa para enfrentar algunos de los desafíos que presentan las VEs en la traslación, es que, en el año 2013, Jang y colaboradores fueron los primeros en describir una novedosa metodología para la generación de vesículas de manera artificial a partir de células[108]. Ellos los denominaron exosomas miméticos, ya que son diseñados para imitar la estructura, tamaño y función de los exosomas convencionales. A diferencia de las VEs, que son secretados directamente desde células, los exosomas miméticos se fabrican utilizando diversas técnicas de ingeniería que permiten un control más preciso

sobre su composición, tamaño y contenido. Además, pueden ser diseñados para evitar la inmunogenicidad y mejorar su biodistribución y estabilidad *in vivo*. Esto los convierte en una herramienta prometedora para aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y de administración de fármacos[109].

La fabricación de estas vesículas se realiza mediante extrusión celular que consiste básicamente en pasar suspensiones celulares a través de una serie de membranas de policarbonato con tamaños de poro decreciente, logrando mediante la ruptura y formación en serie, nanovesículas con producciones del orden de 10 a 1000 veces mayores a las VEs convencionales, y una representación de todos los componentes de las células de origen en el cargo, permitiendo modificar el contenido de las vesículas con la modificación previa de las células[110,111].

En mayo de este año (2024), por primera vez la sociedad internacional de vesículas extracelulares (ISEV) se pronunció respecto a esta nueva clase de vesículas, sugiriendo que la correcta denominación debe ser vesículas artificiales derivadas de células (ACDV)[112].

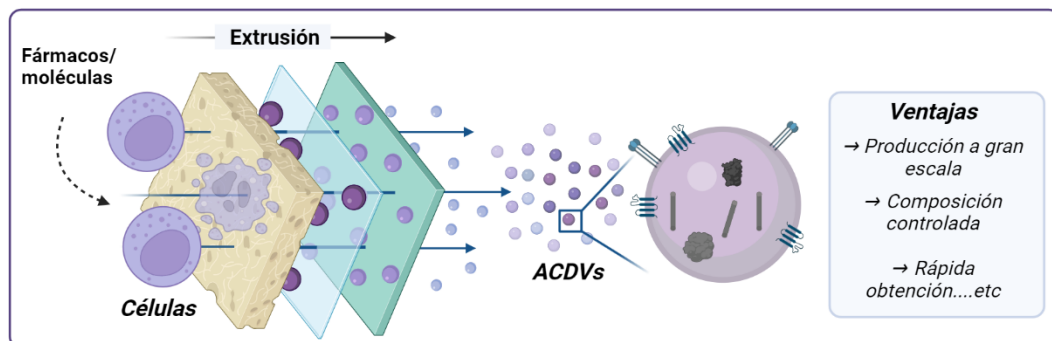


Figura 11. Esquema ilustrativo de la generación de extrusomas.

En la actualidad, se han publicado cerca de 160 artículos describiendo los potenciales roles que pueden tener las ACDVs como tratamiento, enfocados principalmente como sistemas de liberación de nanofármacos. Un ejemplo de ello son las ACDVs derivados de macrófagos en conjunto a la administración de anticuerpos anti-ligando de muerte programada 1 (PD-L1) para potenciar la eficacia del tratamiento en modelos de carcinoma de colon con resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*[113]. También se ha realizado el encapsulamiento del quimioterapéutico doxorubicina en ACDVs de monocitos humanos (línea celular THP-1), demostrando mayor eficacia que el fármaco libre en modelos 2D y 3D de cáncer de ovario[110].

Además, se ha reportado un trabajo de ACDVs derivados de células NK, en donde determinaron el efecto citotóxico en distintas líneas de cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*, mostrando disminuciones significativas tanto en el número, volumen y peso tumoral con la administración de los EM derivados de NK[114].

De acuerdo con los antecedentes previos, es que se propone determinar el efecto que tendrán los EM derivados de células NK con docetaxel como cargo sobre la viabilidad celular en cultivos de líneas celulares de cáncer de pulmón.

FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Los extrusomas derivados de células Natural Killer cargados con docetaxel presentan una mayor eficacia citotóxica en comparación con los extrusomas no cargados y las vesículas extracelulares, siendo capaces de internalizarse para inducir apoptosis en cultivos celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

a. Objetivo General

Evaluar la composición de los extrusomas derivados de células Natural Killer cargados con docetaxel en comparación con extrusomas no cargados y vesículas extracelulares, y determinar el papel de los mecanismos de internalización por fusión de membrana, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina/caveola y Evaluar la eficacia citotóxica en conjunto a la inducción de apoptosis en cultivos celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

b. Objetivos Específicos

- I. Generar y Caracterizar los extrusomas obtenidos de células Natural Killer cargados con docetaxel.
- II. Estudiar los mecanismos de internalización fusión de membrana, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina/caveola en células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas.
- III. Evaluar el efecto citotóxico de los extrusomas obtenidos de células Natural Killer cargados con docetaxel en cultivos celulares de carcinoma pulmonar de células no pequeñas.
- IV. Evaluar la inducción de la muerte celular por apoptosis de los extrusomas obtenidos de células Natural Killer cargados con docetaxel.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de vesículas extracelulares de NK y extrusomas

3.1.1. Aislamiento de vesículas extracelulares

La línea celular NK-92 (ATCC CRL-2407) se cultivó en medio avanzado de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco cat#12633-012) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (Biological Industries cat# DW101203-031), 1X glutamax (Gibco cat# A1286001), 10% de FBS inactivado por calor (Gibco cat# 12657029) y 50 ng/mL de Interleucina-2 humana recombinante (rhIL-2, R&D system cat#BT-002). Este medio se denomina "medio-NK".

Para aislar las vesículas extracelulares de las células NK (denominadas en adelante "EVs"), se sembraron 1×10^6 células/mL en medio sin suero AIM-V (Gibco cat#12055-083) suplementado con 50 ng/mL de rhIL-2 y se incubaron durante 48 horas. El medio acondicionado se recolectó y se centrifugó a 300xg durante 5 min, 2000xg durante 30 min a 4°C para eliminar los restos celulares[115]. Posteriormente, el medio condicionado se filtró (0.22 μ m) y se ultracentrifugó a 100.000xg a 4°C durante 1h (Hanil 5, rotor fijo, Corea). El pellet resultante se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco cat#10010-023). Finalmente, el pellet se resuspendió en 100 μ L de PBS y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

3.2. Generación de extrusomas NK

Las extrusomas NK (denominados en adelante "EXTs") se generaron a partir de la línea celular NK-92 siguiendo el protocolo de Jang et al. 2013, con algunas modificaciones. Las células se recolectaron, centrifugaron y resuspendieron en PBS a 5×10^6 células/mL. El docetaxel (Tocris, EE. UU. cat# TO.4056/10) se encapsuló añadiendo 100 $\mu\text{g/mL}$ del fármaco antes de la extrusión (denominados en adelante "DTX-EXTs"). Posteriormente, las células se extruyeron secuencialmente (mini-extrusor Avanti) utilizando filtros de membrana de policarbonato con tamaños de poro de 10, 5 y 1 μm (Isopore cat# TCTP02500, Whatman cyclopore cat# WHA70602513, Avanti cat# 610010). Las muestras se pasaron siete veces por cada membrana. Los EXTs y DTX-EXTs se concentraron mediante ultracentrifugación a 100,000xg a 4°C durante 1h y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior [20].

3.3. Caracterización de vesículas extracelulares y extrusomas

3.3.1. Análisis de Seguimiento de Nanopartículas (NTA)

Para determinar el tamaño medio y modal de las vesículas, así como su concentración y distribución de tamaño, se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). Las muestras de EVs, EXTs y DTX-EXTs se diluyeron en PBS fresco y filtrado 1X en proporciones de 1:100 a 1:3000 y se analizaron usando un instrumento NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Malvern, Reino

Unido) bajo condiciones de flujo constante (velocidad de flujo = 20) a 25 °C. Se capturaron cuatro videos de 60 s para cada muestra. El análisis de datos se realizó utilizando el software NTA con un umbral de detección de 5 y un nivel de cámara de 8.

3.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La morfología de las vesículas se visualizó mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), como se describió previamente [23]. Brevemente, se transfirieron 5µL de muestras de suspensión de vesículas (diluidas 1:10) a una rejilla de cobre de 300 mallas con película de formvar recubierta de carbono (FCF300-CU25, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.) y se dejó adsorber durante 60 s. El exceso de muestra se eliminó con papel de filtro y se tiñó con acetato de uranilo acuoso al 1% durante 60 s. Se eliminó el exceso de tinción y la muestra se dejó secar durante 24h a temperatura ambiente. Las imágenes se adquirieron con un microscopio Talos F200C G2 y se analizaron con el software Velox Imaging.

3.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Se realizó el análisis topológico de las EVs y EXTs mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), de acuerdo con lo descrito previamente por Leiva-Sabadini C. y colaboradores[116]. Brevemente, las muestras se inmovilizaron en discos

de mica recién divididos (12 mm de diámetro; Electron Microscopy Sciences, EE. UU.) recubiertos con una solución de 0.1 M de poli-L-lisina (PLL, Sigma Aldrich, EE. UU.), Las muestras se montaron en un microscopio AFM Asylum MFP 3D-SA (Asylum Research, EE. UU.) y se analizaron en modo de contacto intermitente (modo AC) con cantilevers TAP300GD-G (BudgetSensors, Bulgaria), obteniendo imágenes de altura, amplitud y fase de los sustratos bajo condiciones ambientales.

3.4. Potencial Zeta

El potencial Zeta de los EVs, EXTs y DTX-EXTs se analizó utilizando un Zetasizer (Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido. Modelo Pro Red) mediante análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) a temperatura ambiente. Se resuspendieron 20µL de cada muestra con 980µL de agua destilada, y luego se cargaron las muestras en una célula de Zeta Capilar Plegada (Malvern Panalytical, cat#DTS1070). El potencial Zeta se obtuvo utilizando el software ZS Xplorer (Malvern Panalytical). Las muestras se midieron por triplicado con un intervalo de estabilización inicial de 45 s e intervalos de medición de 1 min.

3.5. Cuantificación de Proteínas

La concentración de proteínas de EVs, EXTs y DTX-EXTs se midió con un ensayo de ácido bicinconínico (BCA assay; ThermoFisher Scientific cat#23225)

de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sonificaron 10 μ L de cada muestra durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 190 μ L de la solución de trabajo de BCA y las muestras se incubaron a 60°C durante 10 min después de vortexar. Finalmente, las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560nm con un lector de microplacas (Multiskan Sky, Thermo). La cuantificación de proteínas se graficó como mg/mL de proteína normalizada a 1x10⁶ células.

3.6. Cuantificación de Fosfolípidos

El contenido de fosfolípidos de las muestras aisladas de EVs, EXTs y DTX-NK se cuantificó utilizando un “Kit de ensayo de fosfolípidos” (Sigma Aldrich, cat# MAK122) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, todos los reactivos se calentaron a 20°C (RT). Los estándares se prepararon a 200 μ M, 150 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M y 2.5 μ M. Se mezclaron 10 μ L de estándar o muestra con 90 μ L de la mezcla de reacción del ensayo y se incubaron a RT durante 30 min, protegidos de la luz. Posteriormente, los desechos se eliminaron centrifugando las muestras a 14.000xg y las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos para la medición. La absorbancia se midió a 530nm con un lector de microplacas (Multiskan Sky, Thermo). La determinación total de fosfolípidos de cada grupo de vesículas se normalizó a 1x10⁶ células.

3.7. Análisis por Western Blot de los marcadores exosomales y de células NK

Se realizó un análisis por Western Blot para verificar la presencia de proteínas conocidas de células NK, como Fas ligando (FasL) y perforina, proteínas asociadas con la biogénesis de EVs (Sintenina y gen de susceptibilidad tumoral 101 (TSG101)), proteínas citosólicas como la proteína de choque térmico 70 (HSP70), 90 (HSP90) y Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH), y marcadores de EVs como el grupo de diferenciación 63 (CD63), el 9 (CD9) y Flotilina-1. La calnexina se utilizó como control negativo para la biogénesis de EVs. La información y diluciones de los anticuerpos se encuentra en el anexo.

Las EVs y EXTs aisladas se compararon con el lisado de células NK. Para los lisados celulares, las células NK se lisaron con un buffer para ensayos de inmunoprecipitación radioactiva (RIPA) a 4°C durante 10 min, seguido de centrifugación a 10,000xg durante 10 min. Las proteínas se cuantificaron como se describió anteriormente. Para Western Blot en condiciones reductoras (Alix, TSG101, HSP70, HSP90, Flotilina-1, Calnexina, FasL, perforina y GAPDH), se mezclaron 10µg de cada muestra con el buffer Laemmli de muestra 4X (Biorad, cat#1610747) que contiene solución de ditiotreitól (Sigma Aldrich, cat#43816) a una concentración final de 50 mM, y se incubaron durante 10 min a 95°C. Para condiciones no reductoras (CD63 y CD9), se mezclaron 10µg de la muestra con

el buffer Laemmli de muestra 4X. Las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 10% o 12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Las membranas se bloquearon con una solución bloqueadora (5% de BSA en solución salina tamponada con tris (TBS) con 0.1% de Tween (TBS-T)) en un agitador orbital durante 1h. Los anticuerpos primarios se diluyeron en la solución bloqueadora y se incubaron durante la noche, seguidos de tres lavados con TBS-T durante 10 min. Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante 2h, se lavaron tres veces y finalmente se visualizaron usando un LICORbio Odyssey DLx Imager. El análisis de las imágenes se realizó con el software LICORbio Image Studio Digits versión 5.2.5.

3.8. Determinación del encapsulamiento de docetaxel

Se realizó un análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para cuantificar el docetaxel encapsulado en DTX-EXTs. En resumen, el docetaxel libre se midió utilizando un VWR Hitachi LaChromElite (Hitachi) equipado con un horno de columna, muestreador automático y detector UV-DAD configurado a una longitud de onda de 200 nm. Las corridas en fase inversa comprendieron una fase móvil de acetonitrilo con metanol (grado HPLC, Merck, EE. UU.) en una proporción de 70:30. La velocidad de flujo se mantuvo a 0.6 mL/min, y se inyectaron 5 µL de soluciones estándar o muestras en una columna Kromasil C18 de 3.5 µm, 150 mm x 4.6 mm (Novus). La identificación y cuantificación se

realizaron mediante el tiempo de retención (4 min) y el área de los picos cromatográficos, respectivamente. La curva de calibración para docetaxel es lineal en el rango de 0.078 a 5 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2 = 0.99$). El docetaxel encapsulado se normalizó a 1×10^6 células y se expresó en pmoles por μg de proteína de vesícula[117].

3.9. Análisis Proteómico

Se realizó un análisis proteómico comparativo usando espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida de alta resolución (LC-MS/MS) en EVs, EXTs y DTX-EXTs para identificar diferencias en la composición. Se precipitaron 30 μg de proteína de cada muestra en perlas de amina, como se describió previamente [25]. Las proteínas precipitadas en las perlas se disolvieron en 50mM de bicarbonato de amonio, se redujeron, se alquilaron y se digirieron con tripsina (proporción enzima: proteína 1:50; Promega) a 37°C durante la noche. Los péptidos resultantes se purificaron utilizando un disco de resina C18 antes del análisis LC-MS/MS con nanoElute acoplado a tims TOF PRO2 (Bruker). La identificación de proteínas y la cuantificación sin etiquetas se realizaron usando el software MaxQuant (versión 2.4.7.0) contra la base de datos humana de UniProt. Los criterios de presencia de proteínas se establecieron como detección en al menos 2 de 3 réplicas biológicas para EVs, EXTs y DTX-EXTs. La visualización de datos para el análisis diferencial de expresión de proteínas de

gránulos citolíticos, receptores de células NK y marcadores de proteínas de EVs se realizó utilizando el software HeatMapper. El análisis de enriquecimiento funcional para procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares se llevó a cabo utilizando FunRich versión 3.1.4 y Graphpad Prism versión 8.0.1, con la información de proteínas obtenida de la base de datos UniProt.

Tabla 1. Líneas celulares y medios de cultivo.

Líneas celulares	medios de cultivo
NK-92	advanced RPMI 1640 suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1X glutamax, 10% de FBS inactivado y 50 ng/mL de IL-2 humana recombinante
THP-1	RPMI 1640 suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina 1X glutamax y 10% de FBS
A549	
H1975	
H1299	

Tabla 2. Clasificación histológica y mutaciones claves de los cultivos de cáncer de pulmón.

Líneas celulares	clasificación	mutaciones claves	mecanismos de resistencia
A549	CNCP	<p>KRAS: Mutación en KRAS G12S (activante).</p> <p>TP53: Sin mutaciones funcionales</p>	<p>Resistencia a inhibidores de EGFR debido a la mutación activante en KRAS, que promueve la señalización independiente de EGFR.</p> <p>Mayor resistencia a quimioterapia basada en cisplatino.</p>
H1975	CNCP	<p>EGFR: Mutaciones en L858R (activante) y T790M.</p> <p>TP53: Mutación en TP53 R273H.</p>	<p>Resistencia a inhibidores de EGFR como gefitinib y erlotinib debido a la mutación T790M.</p> <p>Resistencia asociada con la mutación en TP53, que disminuye la apoptosis inducida por tratamientos.</p>

H1299	CNCP	TP53: Deleción completa del gen TP53 (pérdida total de función).	Resistencia a la apoptosis por pérdida completa de TP53. Menor respuesta a la quimioterapia basada en agentes que inducen daño en el ADN.
-------	------	---	--

3.10. Condiciones de cultivo celular para líneas celulares de cáncer de pulmón

Para evaluar el efecto citotóxico de EVs, EXTs y DTX-EXTs, se emplearon las líneas celulares de carcinoma de pulmón A549 y H1975. Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Capricorn Scientifica, cat# RPMI-A) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (Biological Industries cat# DW101203-031), 1X glutamax (Gibco cat# A1286001), y 10% de FBS (Sigma Aldrich cat#F7524). Todas las líneas celulares se mantuvieron bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5% de CO₂), y los experimentos se realizaron con células al 80% de confluencia.

3.11. Marcaje fluorescente de EVs, EXTs y EXT-DTXs

Para rastrear las vesículas (EVs, EXTs y EXT-DTX) con microscopía confocal y citometría de flujo, todos los tipos de vesículas se tiñeron con éster succinimidil de carboxifluoresceína (Cell Trace CFSE; ThermoFisher Scientific cat#C34554). Se añadió CFSE a una concentración de 100 μ M, y las vesículas se incubaron a 37°C durante 2h, protegiéndolas de la luz. Posteriormente, las vesículas se lavaron dos veces con PBS mediante ultracentrifugación, y el pellet se resuspendió en 100 μ L de PBS. La concentración de partículas se midió con NTA, y las vesículas marcadas se almacenaron a -80°C.

3.12. Visualización de la captación de vesículas con microscopía confocal

Las células A549 y NCI-H1975 se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm a una densidad de 1.5 x 10⁴ células/cm² y se dejaron adherir durante la noche. Las células se incubaron con vesículas marcadas con CFSE a una proporción célula-vesícula de 1:2.500 durante 4h a una temperatura de 37°C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo celular, y las células se lavaron tres veces con PBS 1X para eliminar todas las vesículas residuales. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% a temperatura ambiente durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS. Luego, las células se contratiñeron con Hoechst a 10 μ g/ml (Thermo Fisher, cat#33342) durante 5 minutos a temperatura

ambiente. Después de un lavado final, los cubreobjetos se montaron con Fluorsave (Merck, cat#345789). Se tomaron imágenes confocales con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV10i usando el software Olympus Fluoview V4.2b. Se adquirieron 5 imágenes por condición en tres experimentos independientes. Se adquirieron 40 Z-stacks por muestra con un tamaño de paso óptico de 0.5 μm .

3.13. Ensayo de inhibición de la captación

Se analizaron las rutas de captación de EVs, EXTs y DTX-EXTs según lo descrito anteriormente [26]. Las células A549 y NCI-H1975 se sembraron a una densidad de 5×10^4 células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se pretrataron con inhibidores para bloquear cada mecanismo de captación de vesículas (clorpromazina: endocitosis dependiente de clatrina; amilorida: macropinocitosis; omeprazol: fusión de membrana; Fillipin III: endocitosis dependiente de caveolas). Los inhibidores se añadieron a las siguientes concentraciones: clorpromazina (28 μM , 1h; Sigma Aldrich cat #C904), amilorida (50 μM , 1h; Sigma Aldrich PHR1839), omeprazol (1mM, 1h, Sigma Aldrich cat# PHR1059), y Fillipin III (7.5 μM , 15 min; Sigma Aldrich cat# F4767). Las células se incubaron con 250 vesículas CFSE por célula durante 4 horas. Las células sin vesículas y las células con vesículas CFSE sirvieron como controles. Posteriormente, las células se desprendieron con accutase (Sigma Aldrich,

cat#A6964), se centrifugaron a 400xg durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron con 1 mL de PBS, se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 300 µl de PBS. La incorporación de vesículas se evaluó mediante citometría de flujo (BD FACS Canto II), adquiriendo al menos 10,000 eventos por muestra. Los datos se analizaron con el software FlowJo (TreeStar, versión 8.8.6), y los resultados se presentaron como un porcentaje del control de vesículas CFSE.

3.14. Efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs

3.14.1. Ensayo de MTT

Se utilizó el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (ensayo MTT, Sigma Aldrich cat#M5655) para evaluar la actividad metabólica, que es un indicador de viabilidad celular, para determinar los efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs se evaluaron midiendo la actividad metabólica en 2 líneas celulares diferentes de cáncer de pulmón (ATCC A549 y ATCC NCI-H1975) con el ensayo. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.5×10^4 (A549) o 3.3×10^4 (H1975) células por cm^2 y se dejaron adherir durante la noche. Posteriormente, se añadieron EVs, EXTs y DTX-EXTs a concentraciones que variaron de 0.025 a 5 µg de proteína/pocillo. Después de 48h, se añadió MTT a cada pocillo a una concentración final de 0.5 mg/mL, y las células se incubaron a 37°C durante 2h. Los cristales de formazán resultantes se disolvieron en 40µL

de DMSO durante 15 min a 37°C. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Multiskan Sky, Thermo Scientific, EE. UU.). Los datos se presentan como un porcentaje del control positivo (medio de cultivo y vehículo, en este caso, PBS), y se realizaron al menos tres experimentos independientes con duplicados biológicos.

3.14.2. Apoptosis celular

La apoptosis celular se evaluó con el ensayo de detección de Caspasa 3/7 CellEvent (Invitrogen, cat#C10423), con algunas modificaciones. Las células A549 y H1975 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células por pocillo y se dejaron adherir durante la noche. Se añadieron EVs, EXTs y DTX-EXTs a concentraciones que variaron de 0.025 a 5 µg/pocillo; los grupos de control incluyeron células no tratadas y células tratadas con 20% de DMSO como control positivo de apoptosis. Las células se incubaron con los tratamientos en combinación con la sonda de detección de caspasa 3/7 a una concentración final de 1.25 µM durante 24h protegidas de la luz. Después de los tratamientos, se recuperó el sobrenadante y las células se desprendieron usando 50µL de accutase durante 10 min, se neutralizó con 100µL de medio de cultivo y se centrifugó a 400xg durante 5 min. El pellet celular se resuspendió en 300µL de PBS que contenía 2% de FBS, y se añadió el sobrenadante previamente recuperado. Para detectar células muertas, las células se tiñeron con Ioduro de

Propidio (PI, Sigma Aldrich, cat#P4864) a una concentración final de 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 2 min a 4°C, protegidas de la luz. Las células apoptóticas y muertas se detectaron mediante citometría de flujo BD FACS Canto II, adquiriendo 5000 eventos por muestra. El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo versión 10.9.0. Las células se analizaron para apoptosis temprana (solo Caspasa 3/7 positiva), tardía (Caspasa 3/7 y PI positivas), y total (suma de ambas) usando el método de cuadrantes.

3.15. Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como diagramas de caja con valores mínimos y máximos, y se trazaron líneas en la media. La distribución normal se probó con la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos con distribución normal se analizaron con pruebas paramétricas (prueba t de Student para 2 grupos y análisis de varianza de una vía (ANOVA) para grupos múltiples). Los datos con distribución no paramétrica se analizaron utilizando la prueba de Mann-Whitney para comparaciones por pares y Kruskal Wallis para comparaciones múltiples. Se realizó una prueba de identificación de valores atípicos con el método ROUT y con $Q=0.01$. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$. Todos los experimentos se realizaron en al menos tres experimentos independientes.

3.16. Metodología de experimentos adicionales.

3.16.1. Incorporación de cisplatino

El encapsulamiento de cisplatino (Sigma-Aldrich, cat#PHR1624) se realizó durante el proceso de extrusión, igual a lo descrito anteriormente para DTX.

Se realizó un análisis por HPLC para cuantificar el CIS encapsulado en CIS-EXTs. En resumen, el cisplatino libre se midió utilizando un VWR Hitachi LaChromElite (Hitachi) equipado con un horno de columna, muestreador automático y detector UV-DAD configurado a una longitud de onda de 227 nm. Las corridas en fase inversa comprendieron una fase móvil de acetonitrilo (grado HPLC, Merck, EE. UU.) se realizaron en primera instancia en una proporción de 80:20 con ácido fórmico al 0.1%. La velocidad de flujo se mantuvo a 0.8 mL/min, y se inyectaron 10 µl de soluciones estándar en una columna Kromasil C18 de 3.5 µm, 150 mm x 4.6 mm (Novus). Posteriormente, se realizaron corridas en fase inversa comprendieron una fase móvil de acetonitrilo se realizaron en primera instancia en una proporción de 45:55. La velocidad de flujo se mantuvo a 1 mL/min, y se inyectaron 10 µl de soluciones estándar en la columna C18 de acuerdo a lo descrito previamente por Zhang y colaboradores[118].

3.16.2. Diferenciación de monocitos a macrofagos fenotipo M1

A partir de cultivos de la línea celular THP-1 (ATCC TIB-202) correspondiente a monocitos humanos, se estimularon con medio de mantención suplementado con

añadió PMA (forbol 12-miristato 13-acetato; Sigma-Aldrich cat# P1585) a una concentración final de 25 nM/mL durante 48h para inducir la diferenciación a macrófagos M0. Posteriormente, se realizó el lavado de las células, ya que el cambio de fenotipo de monocitos a macrófagos cambia de cultivos en suspensión a cultivos adherentes, y se dejaron con medio de mantención por 24h. Posteriormente, se realizó la activación de los macrófagos hacia un fenotipo M1 (pro-inflamatorio), para ello, las células fueron activadas con medio de mantención suplementado con LPS (lipopolisacárido; Sigma-Aldrich cat# L4391) a una concentración de 1 µg/mL durante 24h.

3.16.3. Fenotipificación de macrófagos M0 y M1 por ELISA

Para la cuantificación de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los monocitos, macrófagos M0 y macrófagos con polarización a fenotipo M1, se realizó el ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), siguiendo las indicaciones publicadas previamente[119]. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente utilizando ELISAs tipo sándwich Duoset de R&D Systems, para la determinación de IL-1 β (cat# DY201), IL-6 (cat# DY206) y TNF- α (cat# DY210). Brevemente, se sembraron 5×10^4 células de monocitos, macrófagos M0 y macrófagos M1 en placas de 6 pocillos con 700µL de medio de cultivo por 24h para cuantificar la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Por otro lado, se incubaron placas de 96 pocillos con 100 µl de anticuerpo de captura correspondiente

durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas fueron lavadas con buffer de lavado (PBS al 0.5% Tween), se bloquearon los pocillos con PBS al 1% de albúmina sérica bovina durante 1h. Luego se incubaron con estándares (2000-15 pg/ml) y 75 µL de muestras, por duplicado, durante 2 horas. Tras la incubación, se retiraron las muestras y se realizaron varios lavados, para posteriormente añadir 100 µL de un anticuerpo de detección biotinilado durante 2h, seguido de 100 µL estreptavidina-HRP durante 20 min en oscuridad para finalizar con 100 µL de sustrato (R&D Systems, cat# DY999). La reacción se detuvo luego de 20 min y se midió la absorción a 450 nm con un lector de microplacas (Multiskan Sky, Thermo). Los resultados obtenidos se normalizaron según la cuantificación del número de células en cada grupo y se analizaron utilizando la herramienta de análisis ELISA de Arigobio (<https://www.arigobio.com/elisa-analysis>).

3.16.4. Aislamiento de EVs derivadas de macrófagos M1

Para aislar los EVs de las células macrófagos M1, se sembraron 5×10^5 células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco cat# 12633-012) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina (Biological Industries cat# DW101203-031), 1X glutamax (Gibco cat# A1286001), 10% de FBS inactivado por calor (Gibco cat# 12657029) previamente depletados de EVs (ultracentrifugado a 100.000xg a 4°C durante 16h) y se incubaron durante 48 horas. El medio condicionado se

recolectó y se centrifugó a 300xg durante 5 min, 2000xg durante 30 min a 4°C para eliminar los restos celulares. Posteriormente, el medio condicionado se filtró (0.22 µm) y se ultracentrifugó a 100.000xg a 4°C durante 1h (Hanil 5, rotor fijo, Corea). El pellet resultante se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Gibco cat#10010-023). Finalmente, el pellet se resuspendió en 100 µL de PBS y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

3.16.5. Determinación del encapsulamiento de docetaxel de manera indirecta en EVs-M1

Se realizó un análisis por HPLC para cuantificar el docetaxel encapsulado en DTX-EXTs-M1 utilizando el protocolo descrito anteriormente con algunas modificaciones. En resumen, la determinación de DTX se hizo de manera indirecta analizando los sobrenadantes de los DTX-EXTs-M1 antes y después de su aislamiento por ultracentrifugación. Se recolectaron 500µL de la dilución de DTX-EXTs-M1 posterior al proceso de extrusión y 500µL del sobrenadante posterior al aislamiento por ultracentrifugación, de tal forma que el porcentaje de encapsulamiento de DTX de manera indirecta se calculó de la siguiente forma:

$$\%EE = \left(\frac{Ci - Cf}{Ci} \right) \times 100$$

3.17. Cultivos en esferoides (3D)

Para la generación de cultivos de esferas de células tumorales de las líneas celulares H1975 y H1299, primero se debe realizar un ensayo de formación de esferas. Se utilizaron células que previamente crecieron en monocapa a un 80% de confluencia, se sembraron cantidades crecientes de células (1×10^3 a 1.2×10^4 por pocillo) en placas de ultra-baja adherencia de 96 pocillos que se pre-tratadas con un recubrimiento con 5 mg/mL de poli(2-hidroxietil metacrilato) (Poli-(HEMA); Sigma-Aldrich cat#P3932) disuelto en etanol al 95% de acuerdo a lo descrito por K. Lawrenson y colaboradores[120]. Las células se incubaron por 24h y se midió el diámetro de las esferas estableciendo como condición de experimentación, esferas de tamaños entre 300 a 400 μm de diámetro.

RESULTADOS

4.1. Caracterización Extrusomas NK

4.1.1. Caracterización morfológica

Las células NK-92 se extruyeron a través de filtros de membrana de policarbonato (EXTs) o se extruyeron en presencia de docetaxel (DTX-EXTs) y, posteriormente, se concentraron mediante ultracentrifugación. Las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de medios condicionados sirvieron como control. Para la caracterización morfológica inicial (Figura 12), se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) y reveló estructuras vesiculares redondas, bien definidas y cerradas en todos los grupos. Todas las poblaciones de vesículas mostraron tamaños dentro del rango esperado para EVs (<200 nm), con DTX-EXTs presentando un diámetro promedio 81 nm mayor que EXTs (Figura 12). Adicionalmente, se utilizó microscopía de fuerza atómica (AFM) para caracterizar la ultraestructura y topología de los EVs y EXTs inmovilizadas en mica, confirmando la forma e integridad de las vesículas a escala nanométrica tanto en las imágenes de altura como en las de amplitud (

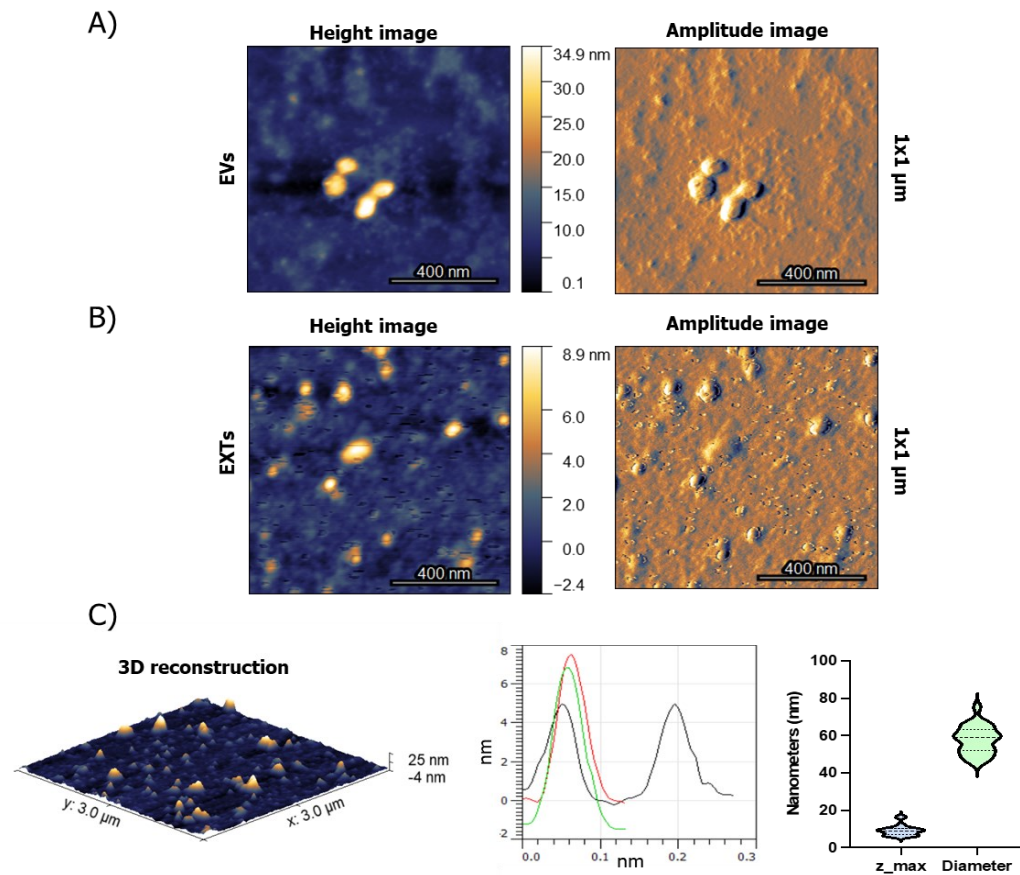


Figura 13). Además, se realizó la reconstrucción 3D y se encontró que las EXTs presentaban una altura media de 9.1 ± 2.8 nm y un tamaño promedio de 59.7 ± 12.2 nm, consistentes con la morfología esperada de las EVs unidas a mica /Figura 13).

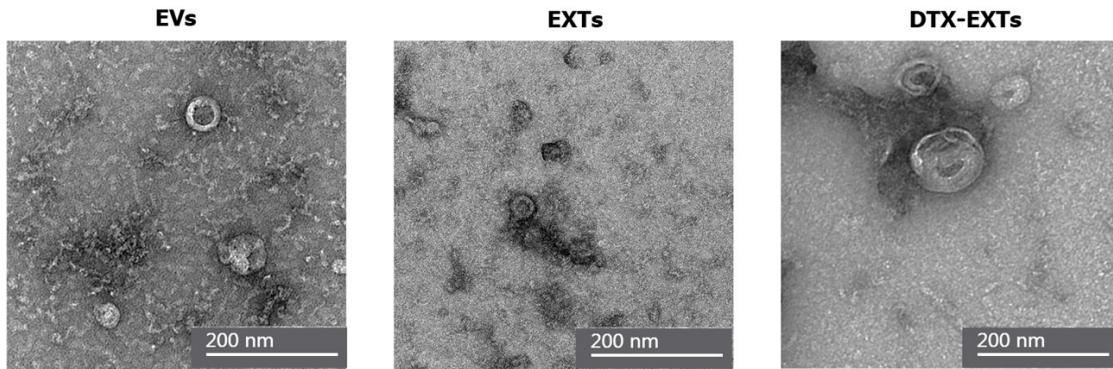


Figura 12. Caracterización morfológica de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivadas de células NK-92. Imágenes representativas de EVs-NK, EXTs y DTX-EXTs obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), barra de escala 200 nm, $n=3$.

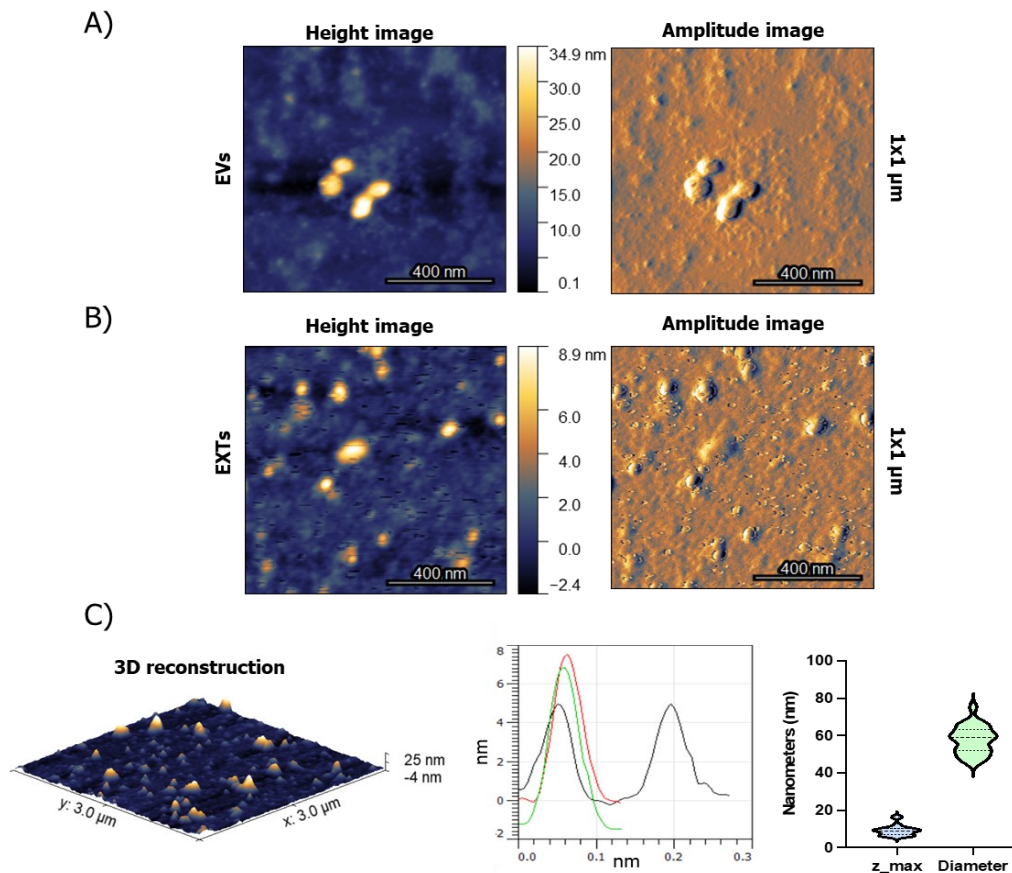


Figura 13. Análisis de topología y estructura de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivadas de células NK-92. (A) Análisis basado en microscopía de fuerza atómica (AFM) de la forma de las EVs; (izquierda) altura, (derecha) amplitud, las vesículas fueron inmovilizadas sobre mica recubierta con PLL; (B) Análisis basado en AFM de la forma de EXTs; (izquierda) altura, (derecha) amplitud, las vesículas fueron inmovilizadas sobre mica recubierta con PLL; (C) Análisis basado en AFM de la forma de EXTs; reconstrucción 3D de la altura (izquierda), análisis de la altura de una sola EXT (centro), y cuantificación de la altura (z máx) y diámetro (derecha). Barra de escala 400 nm.

4.1.2. Cuantificación, perfiles de distribución de tamaño y rendimientos

Los hallazgos morfológicos fueron corroborados por el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), que demostró tamaños modales de 82 ± 22.8 nm, 66.83 ± 13.2 nm y 151.9 ± 17.3 nm para EVs, EXTs y DTX-EXTs, respectivamente (

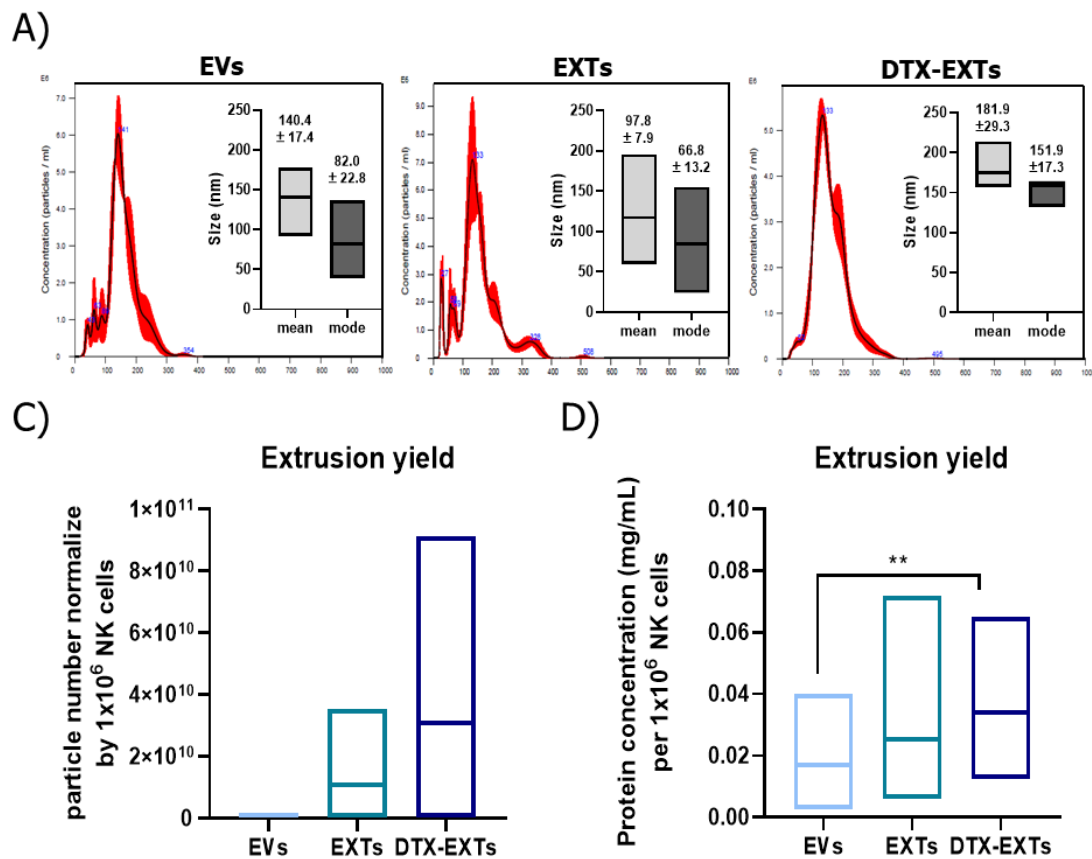


Figura 14). Todas las muestras presentaron distribuciones multimodales, con el

peak en la mayor concentración a tamaños menores de 200 nm, lo que es esperado para vesículas derivadas de células NK.

El rendimiento de producción de EXTs y DTX-EXTs se evaluó cuantificando el número de partículas y la concentración de proteínas normalizadas por 1×10^6 células. Todos los grupos de vesículas presentaron concentraciones del orden 1×10^{10} vesículas/mL. Las EXTs exhibieron un aumento de 64.76 veces en el número de partículas en comparación con las EVs. Al mismo tiempo, las DTX-EXTs mostraron un aumento de 183.15 veces en relación con las EVs y un aumento de 2.82 veces en comparación con las EXTs (

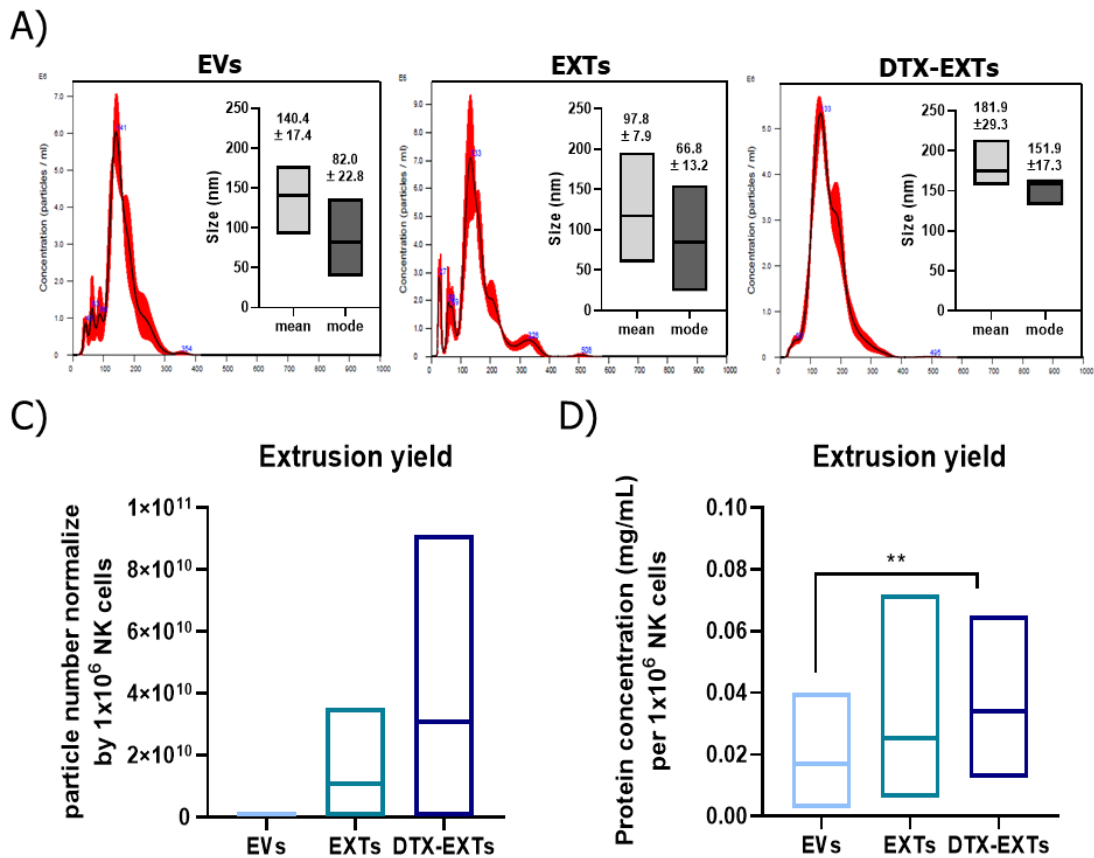


Figura 14), Sin ser significativas.

La concentración de proteínas, medida mediante el ensayo BCA, reveló un aumento de 1.71 veces en las EXTs y un aumento de 2.26 veces en las DTX-EXTs en comparación con las EVs, el cual resultó significativo (

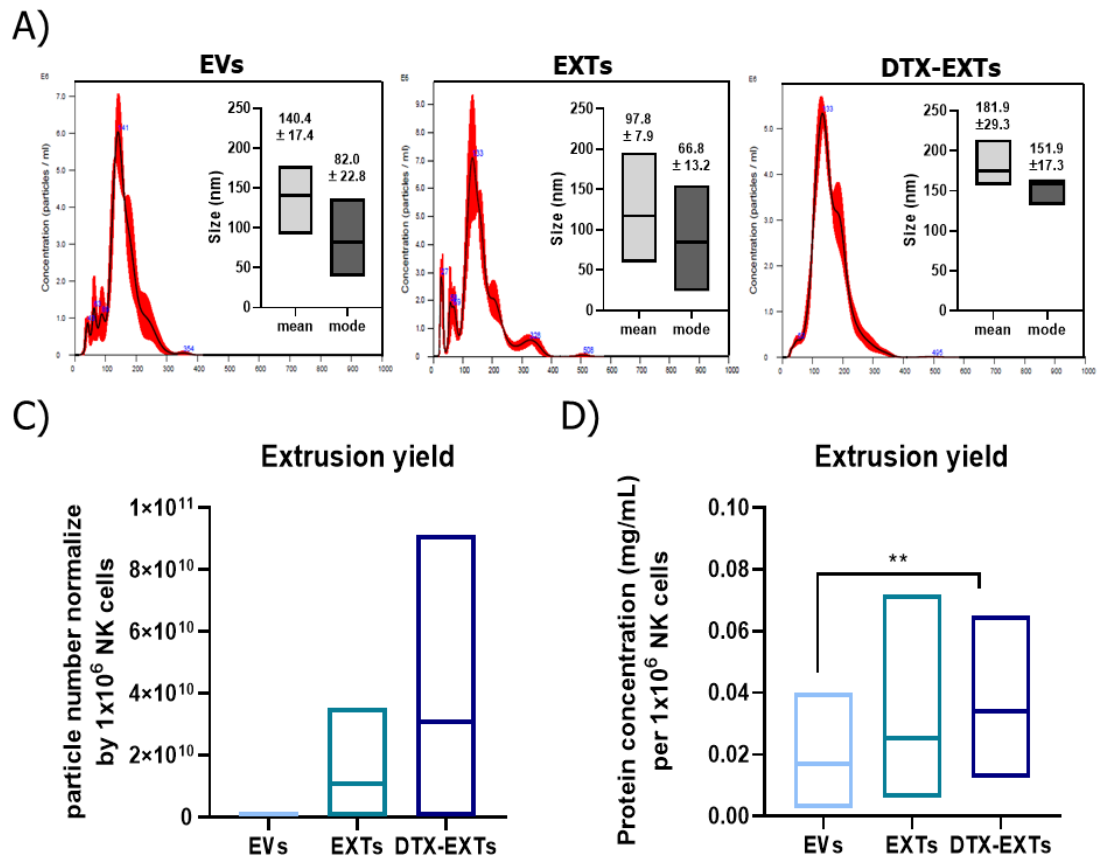


Figura 14).

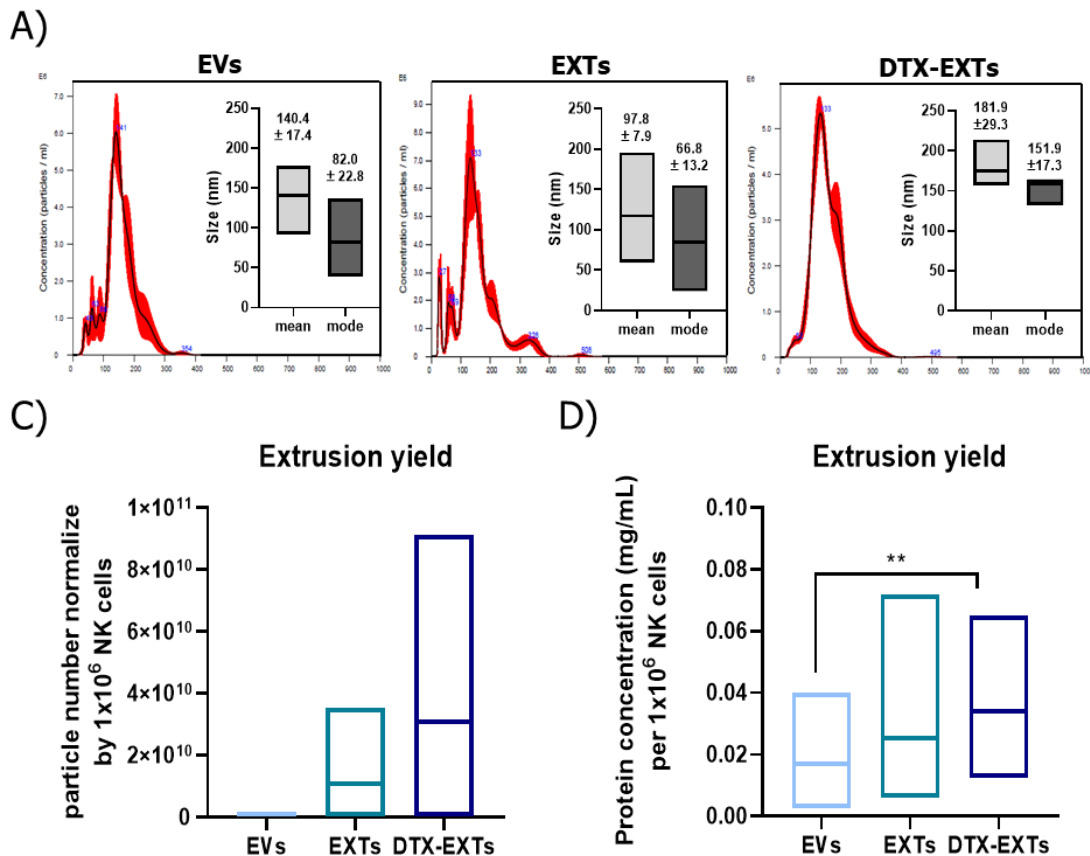


Figura 14. Análisis de perfiles de distribución poblacional y rendimiento de aislamiento de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. (A) Distribución del tamaño y concentración de partículas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). N=3; (B) Rendimiento de la concentración total de partículas determinada por NTA; n=4; (C) Rendimiento de la concentración total de proteínas determinada por el ensayo BCA; n=17; (La significancia estadística se evaluó con la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple y la prueba post-hoc de Dunn. Se utilizó la prueba de

*Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la distribución de los datos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.*

4.1.3. Caracterización molecular de marcadores

Se utilizó el análisis de inmunodetección por western blot para evaluar la composición proteica de las vesículas en comparación con el lisado de células NK. Mientras que el enriquecimiento de TSG101 se observó exclusivamente en las EVs, tanto los EXTs como las EVs exhibieron CD63 y CD9, aunque a niveles más bajos en las EVs. Los marcadores citosólicos HSP70 y HSP90 se detectaron en baja abundancia tanto en las EVs como en los EXTs, en contraste con su abundancia en el lisado celular. Por otro lado, flotilina-1, un marcador asociado con la endocitosis y el tráfico celular, se enriqueció en los EXTs y el lisado celular. Se confirmó la ausencia de calnexina (un marcador exosomal negativo) y GAPDH en las muestras de EVs. Notablemente, las proteínas relacionadas con las células NK, como perforina y FasL, se enriquecieron en los EXTs (Figura 15).

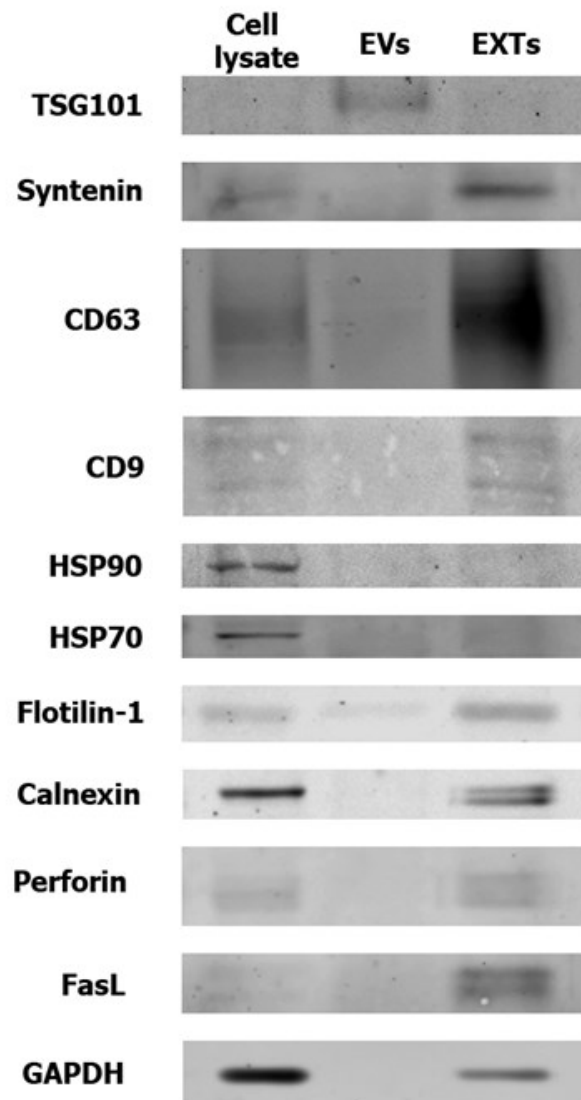


Figura 15. Detección de marcadores proteicos en EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. Imagen representativa de los marcadores de vesículas extracelulares y células NK mediante inmunoblot en lisado completo de células NK-92, vesículas extracelulares y extrusomas de células NK-92; n=3.

4.1.4. Estabilidad coloidal

Para evaluar la estabilidad coloidal de las formulaciones de vesículas, se realizaron mediciones del potencial zeta. Todos los grupos mostraron valores entre -21 y -35 mV, con diferencias significativas observadas solo entre las EVs (-21.34 ± 2.57 mV) y las DTX-EXTs (-35.78 ± 1.29 mV) (Figura 16).

4.1.5. Composición fosfolipídica

Adicionalmente, el análisis del contenido de fosfolípidos demostró un aumento significativo de 11.4 veces en las EXTs en comparación con las EVs (0.38 y 4.35 μ M, respectivamente) (Figura 16). lo que no fue observado en la comparación con DTX-EXTs.

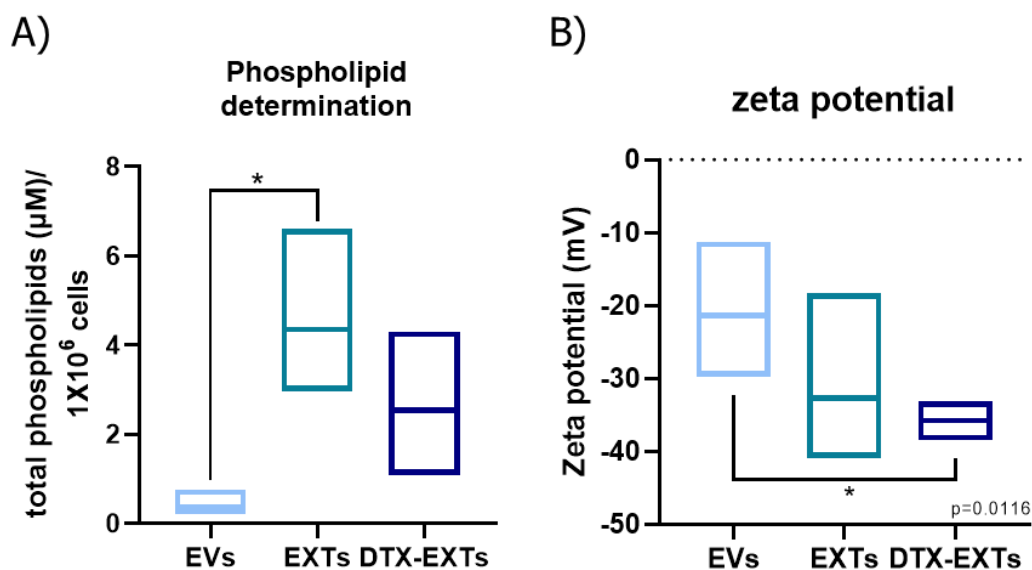


Figura 16. Análisis de composición fosfolipídica y estabilidad coloidal de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. (A) Potencial zeta; $n=5$; (B) Contenido total de fosfolípidos; $n=4$; Los datos se presentan como diagramas de caja con mínimo, máximo y media. La significancia estadística se evaluó con la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple y la prueba post-hoc de Dunn. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de la distribución de los datos, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$.

4.1.6. Determinación Encapsulamiento de Docetaxel

La eficiencia de encapsulación de docetaxel (DTX) (%EE) dentro de los EXTs se determinó mediante HPLC. La identificación y cuantificación de DTX se basaron

en el tiempo de retención y el área del peak (Figura 17). Un cromatograma representativo ilustra la detección de DTX a un tiempo de retención de aproximadamente 4.18 min, distinto del peak del disolvente DMSO (1.8-2.5 min). Se generó una curva de calibración lineal para DTX en el rango de 0.625-100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 = 0.99$; $y = 323160X - 823.68$), lo que permitió una determinación precisa de la concentración de DTX. El %EE calculado fue de $1.31 \pm 1.17\%$, lo que corresponde a una concentración de DTX de 14.06 ± 9.12 pM por μg de proteína de DTX-EXT.

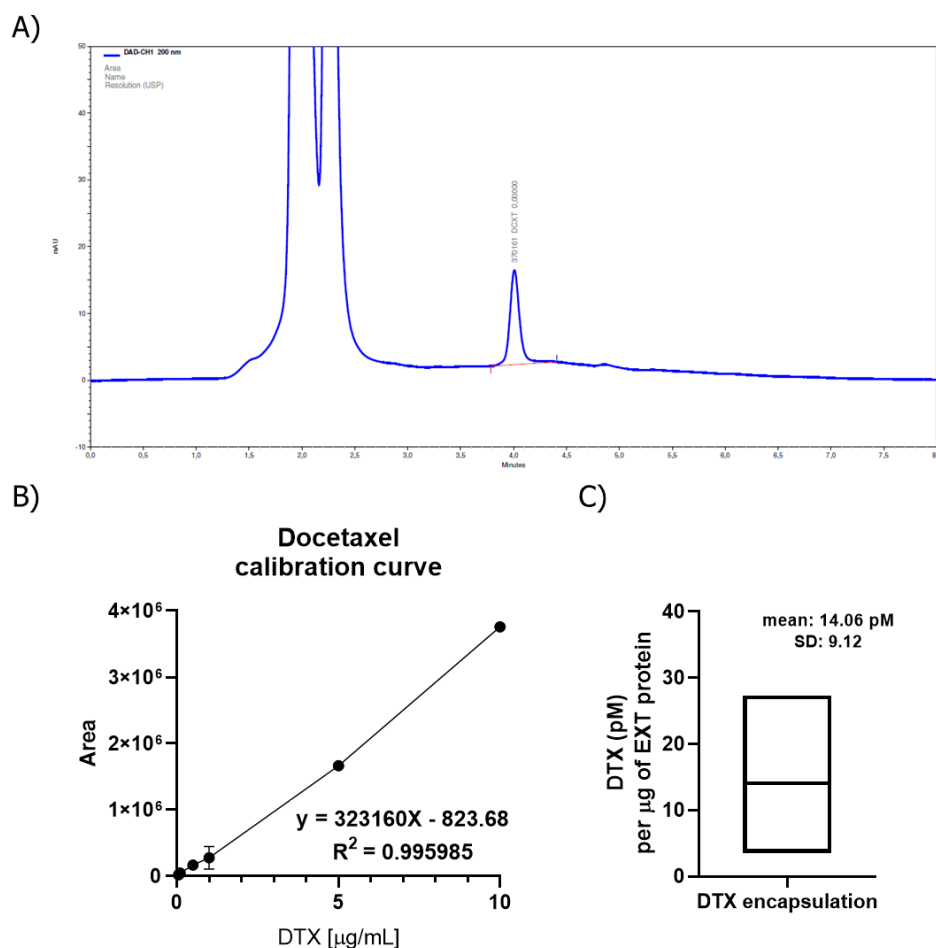


Figura 17. Encapsulación de docetaxel en extrusomas (A) Cromatografía representativa para la determinación de docetaxel. (B) Curva de calibración para la determinación de docetaxel libre. Los datos se presentan como un gráfico lineal con la media y el error \pm SD de 3 experimentos independientes en duplicado. (C) Porcentaje de encapsulación de docetaxel en DTX-EXTs. Los datos se presentan como diagramas de caja con mínimo, máximo y media; $n=7$.

4.1.7. Análisis proteómico

Se identificaron un total de 4045 proteínas con al menos dos valores Tasa de Falsos Descubrimientos (del inglés FDR) válidos, de las cuales el 51.1% mostró expresión diferencial en todas las condiciones. El análisis de componentes principales (PCA) diferenció a las EVs de los EXTs y DTX-EXTs según sus perfiles proteicos. El análisis del diagrama de Venn reveló 2423 proteínas compartidas entre todos los tipos de vesículas, con 1287 específicamente compartidas entre los EXTs y DTX-EXTs. La comparación con Vesiclepedia identificó 2211 proteínas comunes a todos los grupos que eran conocidas como proteínas de EVs. Sin embargo, 231 proteínas en el grupo de EVs, 472 en el grupo de EXTs, y 471 en el grupo de DTX-EXTs no habían sido reportadas previamente como proteínas de EVs (Figura 18).

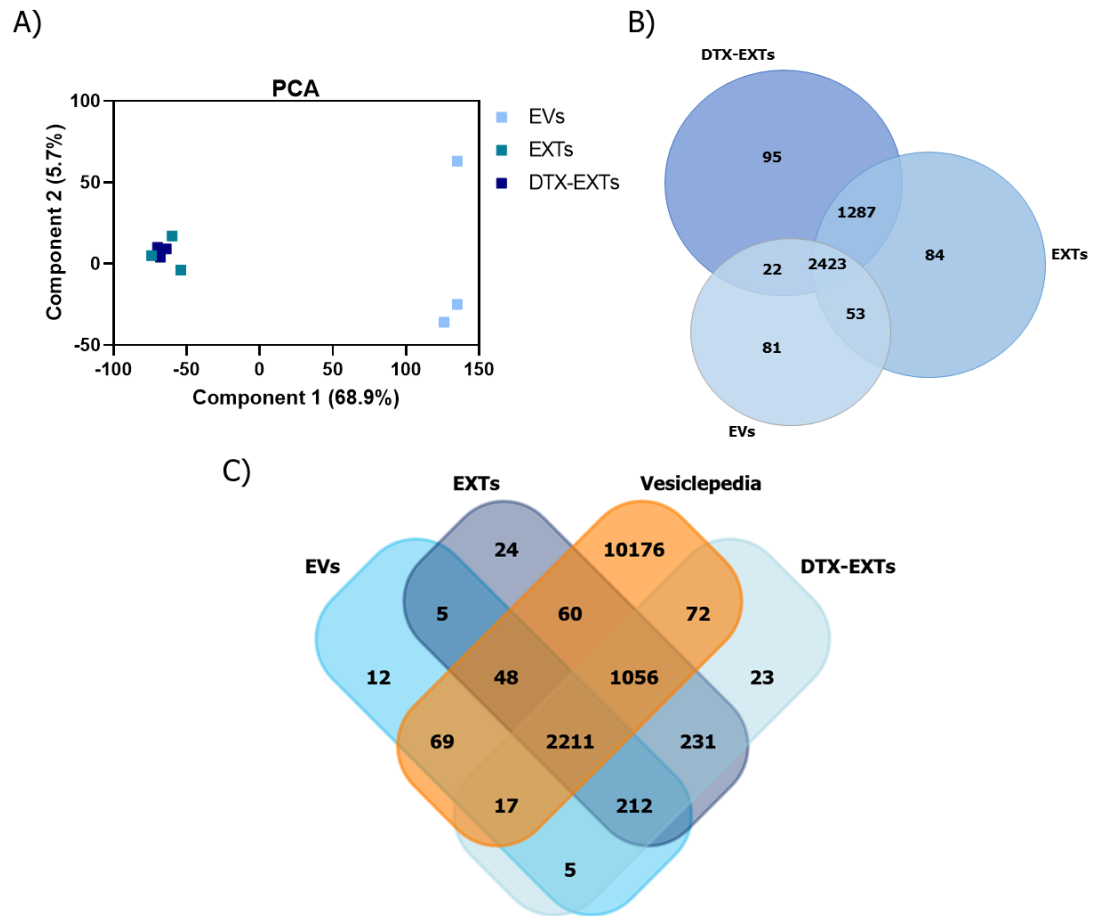


Figura 18. Perfil proteómico comparativo de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. (A) Análisis de componentes principales (PCA) de EVs, EXTs y DTX-EXTs. (B) Diagrama de Venn que muestra las diferencias en los perfiles de proteínas entre todas las proteínas identificadas en EVs, EXTs y DTX-EXTs, con análisis verificado mediante comparación con la base de datos Uniprot. (C) Diagrama de Venn de cuatro vías que muestra las diferencias en los

perfiles de proteínas entre todas las proteínas identificadas en EVs, EXTs y DTX-EXTs, y comparación con proteínas reportadas en Vesiclepedia; N=3.

Adicionalmente, 12 proteínas de EVs, 24 de EXTs y 23 de DTX-EXTs no han sido reportadas previamente en el repositorio de vesiclepedia (Tabla 3).

Tabla 3. Genes y proteínas exclusivas de EVs, EXTs y DTX-EXTs no reportados en Vesiclepedia.

EVs		EXTs		DTX-EXTs	
Gen	Proteína	Gen	Proteína	Gen	Proteína
CYP4V2	Enzima involucrada en la metabolización de ácidos grasos.	SH2D1B	SH2 domain-containing protein 1B	NAXE	N-acetylserotonin O-methyltransferase
EIF2S3B	Eukaryotic translation initiation	H3-3A	Histone H3.3	MTG2	MTG2 protein

	factor 2 subunit 3B				
NTRK2	Neurotrophin tyrosine kinase receptor type 2	PAXBP1	PAX-binding protein 1	UQCC5	Ubiquinone - cytochrome c reductase complex assembly factor 5
LILRA3	Leukocyte immunoglobulin-like receptor A3	MT-ND3	Mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3	ODR4	Odorant receptor 4
TNXA	Tumor necrosis factor alpha- induced protein 6	BIRC8	Baculoviral IAP repeat- containing protein 8	COX10	Cytochrome c oxidase assembly factor 10

ADGRF 5	Adhesion G protein- coupled receptor F5	OGA	O- GlcNAcase	ATP5IF1	ATP synthase F1 subunit epsilon
ADGRG 6	Adhesion G protein- coupled receptor G6	LCMT2	Leucine carboxyl methyltransf erase 2	PRR11	Proline-rich 11
BUD23	Bud23 ribosome biogenesis factor	HGH1	Growth hormone 1	NADK2	NAD kinase 2
STK31	Serine/thre onine- protein kinase 31	ZCCHC10	Zinc finger CCHC domain- containing protein 10	TRAFD1	TRAF family member- associated NF-kB activator 1
SERPIN A11	Serpin peptidase inhibitor,	DNAAF10	Dynein axonemal	NOL10	Nucleolar protein 10

	clade A, member 11		assembly factor 10		
SIKE1	Stress- induced protein kinase 1	UTP25	Utp25 ribosome biogenesis factor	SHARPIN	SH3- domain and ITAM motif- containing protein
HDGFL 3	Heterogene ous nuclear ribonucleop rotein D-like protein 3	CTU1	Cytoplasmic translation upregulator 1	SLC30A9	Zinc transporter 9
		HYPK	Hypoxia- inducible factor 1alpha- interacting protein	SMIM11	Small integral membrane protein 11
		DPH2	Diphosphoin ositol	AGO_2	Argonaute- 2

			pentakisphosphate 2		
		AIRIM	Autoimmune regulator-interacting molecule	TYSND1	Tyrosine-sulfated neuropeptide 1
		TMEM14A	Transmembrane protein 14A	SCFD2	Sec1/Munc18-like protein
		RINT1	Regulator of interaction between cyclin A and CDK2	CLIP4	CLIP-170 (cytoplasmic linker protein)
		ZNRD2	Zinc-finger, RING-type domain protein 2	BSCL2	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2

		FAM8A1	Family with sequence similarity 8, member A1	SLMO2- ATP5E	Small integral membrane protein 2- ATP synthase F0 subunit E
		RCBTB1	RCBTB1 protein	NOL7	Nucleolar protein 7
		SEPTIN11	Septin 11	CAAP1	Calcium- binding and AP1- associated protein 1
		BCL2A1	B-cell lymphoma 2-related protein A1	CEP131	Centrosom al protein 131

		APOL3	Apolipoprote in L3	SMIM20	Small membrane protein 20
		SKA1	Spindle and kinetochore- associated protein 1		

En los gráficos de volcano, se identificaron las 5 proteínas más diferencialmente expresadas entre los tres grupos de vesículas. En el análisis de EVs, se observaron 4 proteínas con las diferencias más significativas en comparación con EXTs (Figura 19). Estas proteínas destacaron por su magnitud de cambio en la expresión y su relevancia estadística en la comparación con EXTs. Un patrón similar se evidenció en la comparación entre EVs y DTX-EXTs, donde las 4 proteínas más diferencialmente expresadas en EVs también mostraron diferencias significativas respecto a DTX-EXTs. Al comparar EXTs con DTX-EXTs, se encontró que EXTs contenía 4 de las 5 proteínas más diferencialmente expresadas entre los dos grupos (Figura 19).

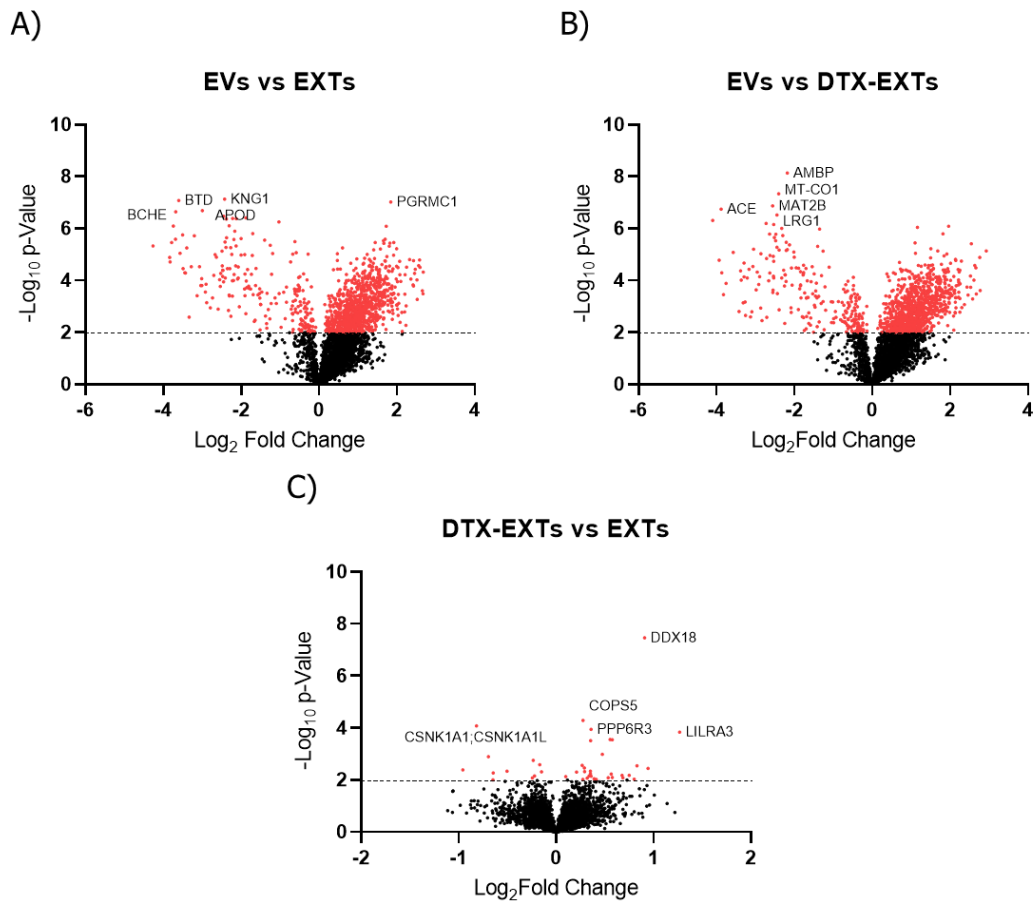


Figura 19. Comparación de perfiles proteómicos diferenciales de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. (A) Volcanograma de proteínas para EVs versus EXTs. (B) Volcanograma de proteínas para EVs versus DTX-EXTs. (C) Volcanograma de proteínas para DTX-EXTs versus EXTs; N=3.

El análisis de enriquecimiento de procesos biológicos indicó que las proteínas de transducción de señales fueron las más abundantes, particularmente en las EVs (6.57%), mientras que las proteínas de transporte fueron las menos prevalentes

en todos los grupos (3.45-3.75%). En cuanto a funciones moleculares, las proteínas de unión al ARN estuvieron enriquecidas en las EVs (24.21-23.48%), y las proteínas citosólicas constituyeron el principal componente celular en todos los tipos de vesículas (52.54-46.28%) (Figura 20).

Se evaluó la abundancia de proteínas de gránulos citolíticos y receptores de células NK para investigar posibles mecanismos de inducción de apoptosis celular. Las proteínas de gránulos citolíticos fueron significativamente más altas en los EXTs y DTX-EXTs que en las EVs al igual que los receptores de membrana de células NK, excepto FCGR3A, que estuvo enriquecido en las EVs

Centrando la atención en 30 proteínas marcadoras de EVs, el análisis de clústeres utilizando distancia euclidiana reveló que CD82 es un marcador específico para las EVs, mientras que otras proteínas estuvieron predominantemente enriquecidas en los EXTs y DTX-EXTs.

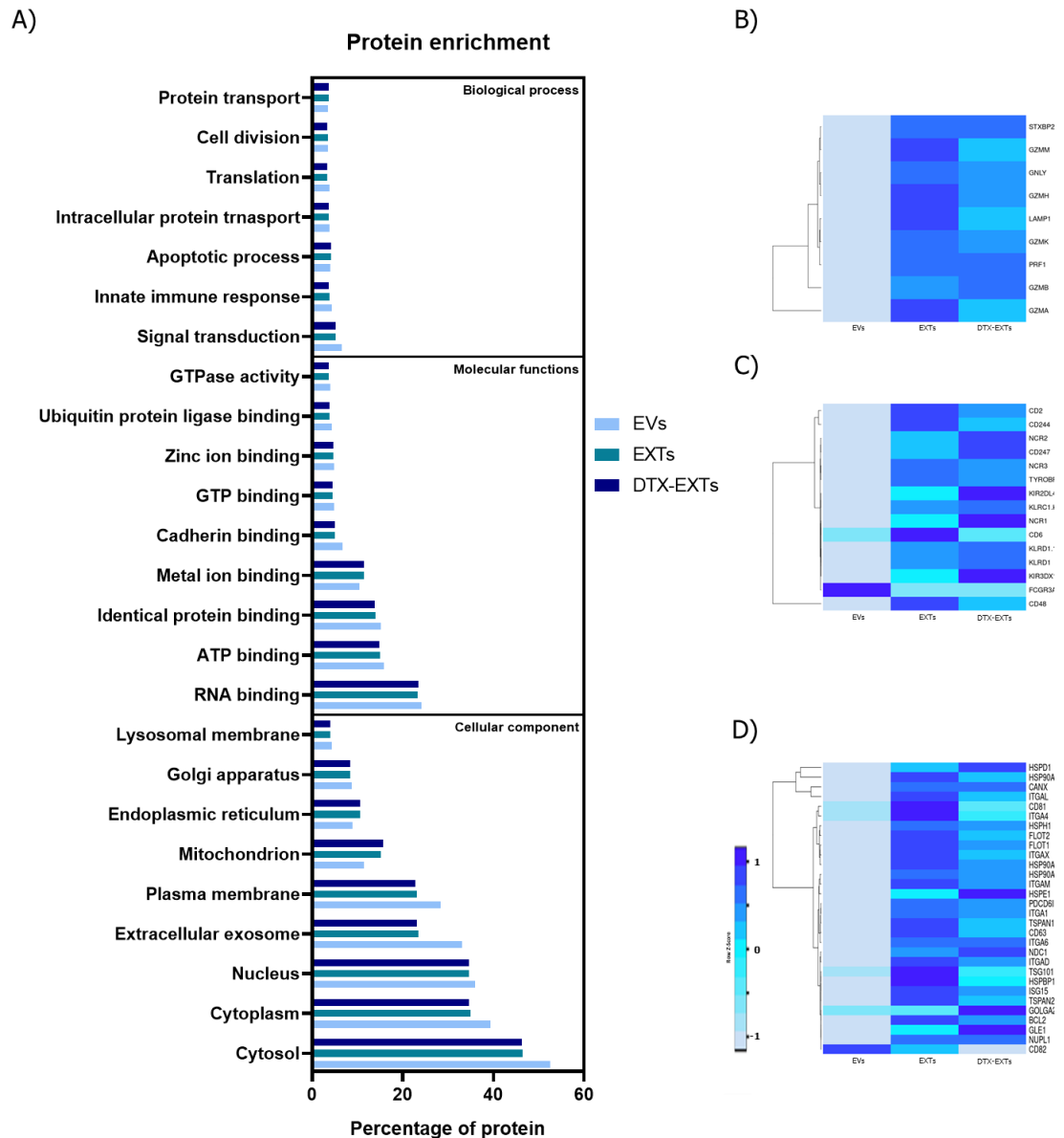


Figura 20. Análisis de proteínas diferencialmente expresadas identificadas en EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92. (A) Enriquecimiento de proteínas involucradas en procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, identificadas en EVs, EXTs y DTX-EXTs; los datos se

muestran como porcentaje de enriquecimiento. (B) Mapa de calor de proteínas de gránulos citotóxicos diferencialmente expresadas. (C) Mapa de calor de proteínas receptoras de células NK diferencialmente expresadas. (D) Mapa de calor de marcadores proteicos diferencialmente expresados en EVs. N=3.

4.2. Interacción Extrusomas de NK y células de carcinoma pulmonar

4.2.1. Internalización

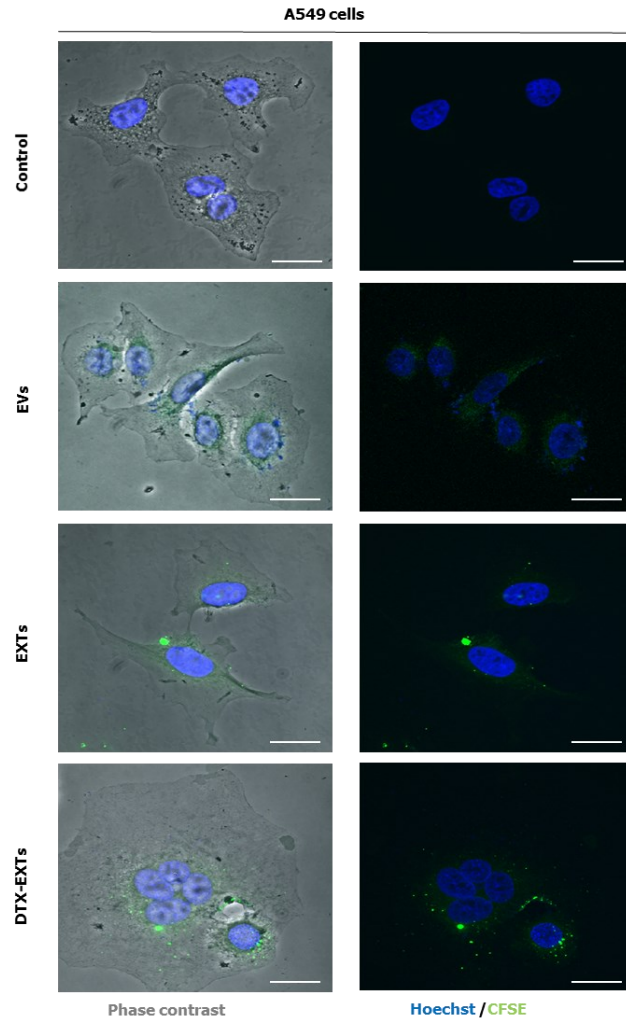
La internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs se evaluó mediante microscopía confocal para dilucidar la colocalización entre los extrusomas y las células de carcinoma de pulmón. Las vesículas se etiquetaron con CFSE y se incubaron con las células durante 4 horas. Las células A549 y H1975 mostraron localización perinuclear de las vesículas, con una mayor intensidad de fluorescencia en las células expuestas a EXTs y DTX-EXTs. El análisis de la pila z confirmó la internalización de las vesículas (Figura 21, Figura 22).

4.2.2. Mecanismos de internalización

Para delinear los mecanismos subyacentes a la captación de vesículas, las células fueron pretratadas con clorpromazina, amilorida, omeprazol y fillipin III para inhibir la endocitosis dependiente de clatrina, la macropinocitosis, la fusión

de membranas y la endocitosis dependiente de caveolas, respectivamente. En las células A549, las cuatro vías endocíticas contribuyeron significativamente a la internalización de vesículas, excepto por un aumento no significativo en la captación con EVs + amilorida y una tendencia hacia una disminución en la internalización con EXTs + fillipin III (Figura 21). Por el contrario, en las células H1975, solo la endocitosis dependiente de clatrina estuvo significativamente involucrada en la internalización de todos los tipos de vesículas. La endocitosis dependiente de caveolas desempeña un papel significativo solo en la internalización de EXTs y DTX-EXTs (Figura 22).

A)



B)

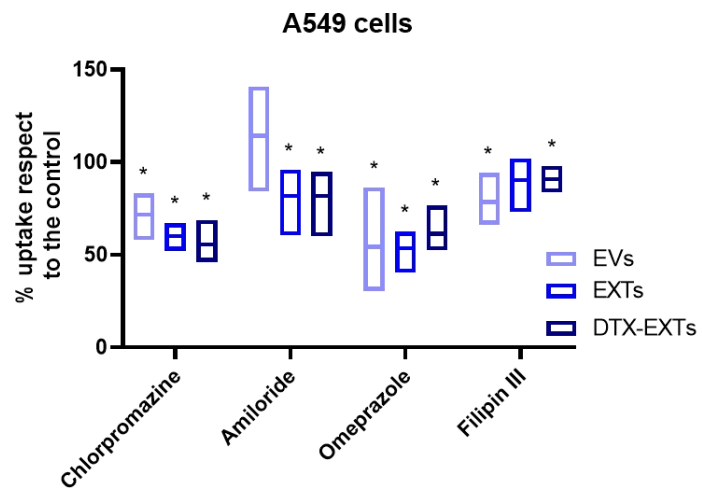


Figura 21. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano. (A) Imágenes de microscopía confocal de células A549 después de 4 horas de incubación con EVs, EXTs y DTX-EXTs marcados con CFSE (verde), comparado con el control sin tinción. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). N=3; (B) Análisis cuantitativo por citometría de flujo de la inhibición de la captación de EVs, EXTs y DTX-EXTs en células A549, utilizando clorpromazina, amilorida, omeprazol y fillipin III como inhibidores. Los datos se presentan como gráficos de caja con valores mínimos, máximos y promedio; n=3; la significancia estadística se evaluó con prueba t múltiple, $*p < 0.05$.

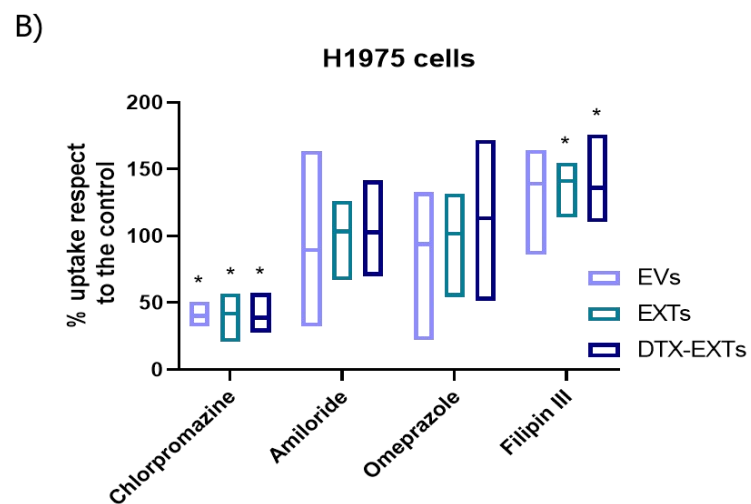
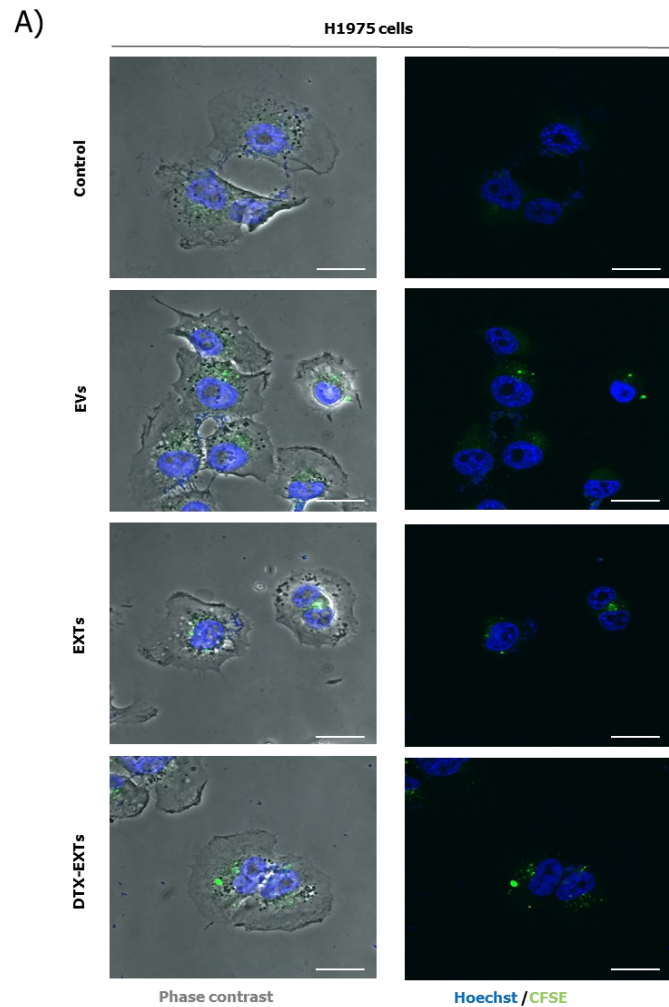


Figura 22. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano. (A) Imágenes de microscopía confocal de células H1975 después de 4 horas de incubación con EVs, EXTs y DTX-EXTs marcados con CFSE (verde), comparado con el control sin tinción. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul). N=3; (B) Análisis cuantitativo por citometría de flujo de la inhibición de la captación de EVs, EXTs y DTX-EXTs en células H1975, utilizando clorpromazina, amilorida, omeprazol y fillipin III como inhibidores. Los datos se presentan como gráficos de caja con valores mínimos, máximos y promedio; n=3; la significancia estadística se evaluó con prueba t múltiple, * $p < 0.05$.

4.3. Efectos citotóxicos

4.3.1. Viabilidad celular

Se evaluaron los efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs en las líneas celulares de carcinoma de pulmón A549 y NCI-H1975. El DTX libre mostró valores de IC₅₀ de 8.86 nM y 21.13 nM en células A549 y H1975 después de un tratamiento de 48 horas (Figura 23).

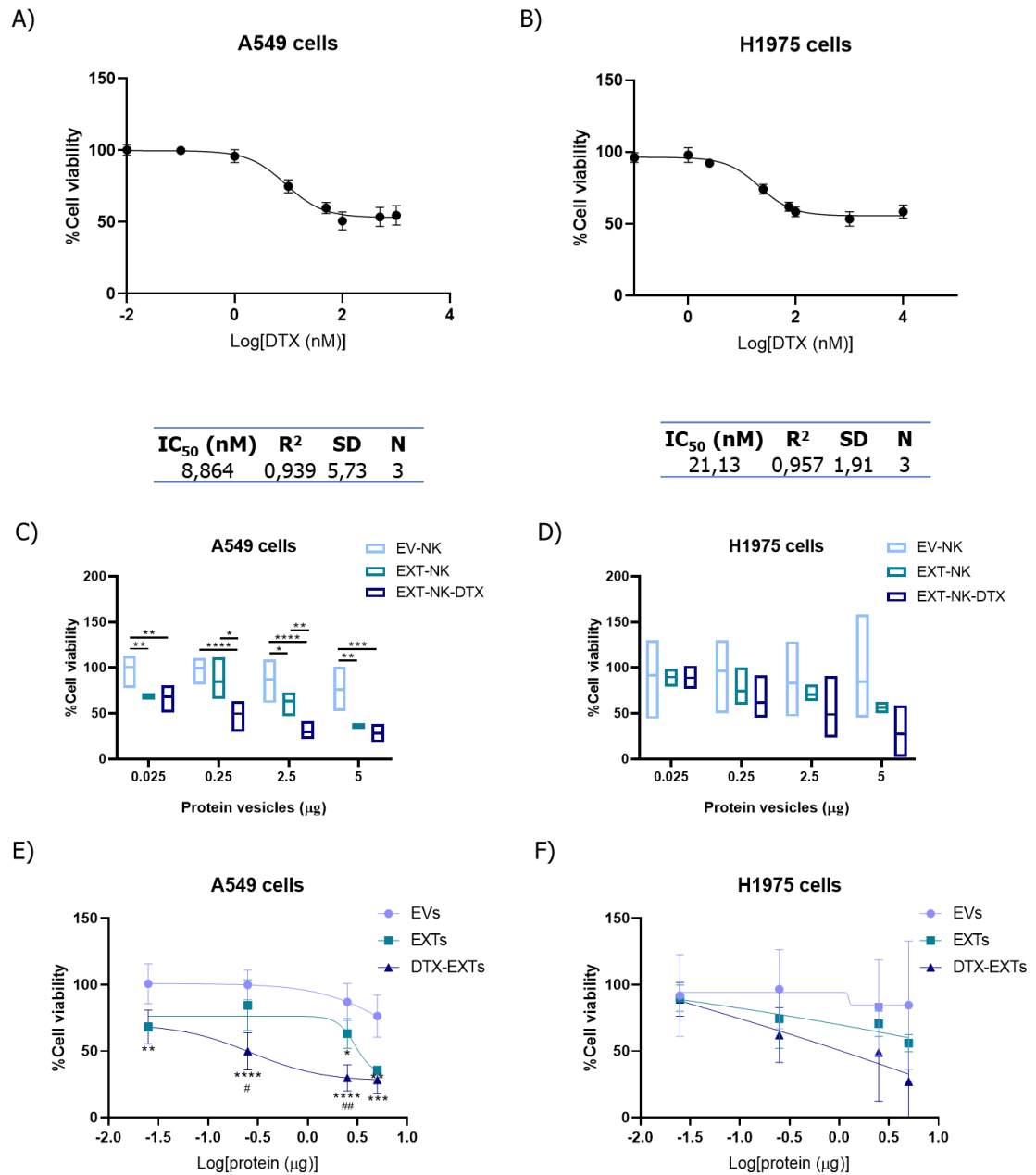


Figura 23. Valores de IC₅₀ de docetaxel a las 48 horas y efectos citotóxicos de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer

de pulmón humano. (A) Células A549 y (B) células H1975 después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de docetaxel. Los valores de IC50 se determinaron a partir de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Los datos se presentan como curvas de inhibición de dosis-respuesta con regresión no lineal, mostrando el promedio y \pm SD de triplicados de 3 experimentos independientes; $n=3-4$. (C/D) Efectos citotóxicos en células A549 (C) y células H1975 (D) después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de proteínas de EVs, EXTs y DTX-EXTs, determinados por el ensayo MTT. $n=3-4$; (E/F) Curva de dosis-respuesta (regresión no lineal de modelo log-logístico de cuatro parámetros) de los efectos citotóxicos en células A549 (E) y células H1975 (F) después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de proteínas de EVs, EXTs y DTX-EXTs, determinados por el ensayo MTT. $n=3-4$; La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.

La citotoxicidad mediada por vesículas se evaluó mediante el ensayo MTT después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de proteína (0.025-5 $\mu\text{g/pocillo}$). EXTs y DTX-EXTs demostraron una citotoxicidad significativamente mayor que los EVs en la mayoría de las condiciones, excepto a 0.05 $\mu\text{g/pocillo}$. Aunque se observó una diferencia significativa entre DTX-EXTs y EXTs en el rango de 0.25-2.5 $\mu\text{g/pocillo}$, las células H1975 mostraron menor

sensibilidad a todos los tratamientos, con solo una tendencia no significativa hacia un aumento de la citotoxicidad a concentraciones más altas (Figura 23).

4.3.2. Inducción de apoptosis

Para evaluar los efectos apoptóticos, se cuantificó la apoptosis temprana, tardía y total en ambas líneas celulares tras el tratamiento con vesículas en concentraciones de 0.025 a 5 µg/pocillo. La apoptosis temprana se indica por células positivas para Caspasa 3/7, mientras que la apoptosis tardía se marca por células positivas tanto para Caspasa 3/7 como para PI. La apoptosis total se define como la suma de células en apoptosis temprana y tardía. Se observó un aumento significativo en la apoptosis total a las concentraciones más altas, pero con respuestas distintas entre las dos líneas celulares (Figura 25). En las células A549, los DTX-EXTs indujeron un aumento marcado en la apoptosis temprana en comparación con EXTs y EVs, especialmente a la concentración más alta ($38 \pm 7.8\%$ vs. $27 \pm 6.9\%$ y $3 \pm 1.4\%$, respectivamente). Se observó una tendencia similar para la apoptosis tardía ($52 \pm 10.4\%$ vs. $46 \pm 19.3\%$ y $16 \pm 1.8\%$ para DTX-EXTs, EXTs y EVs, respectivamente).

Por el contrario, las células H1975 mostraron una respuesta diferente. No se observaron diferencias significativas en la apoptosis temprana entre los tres tipos

de vesículas, mientras que la apoptosis tardía aumentó significativamente a la concentración más alta de DTX-EXTs. Estos hallazgos sugieren una mayor resistencia a la apoptosis en las células H1975.

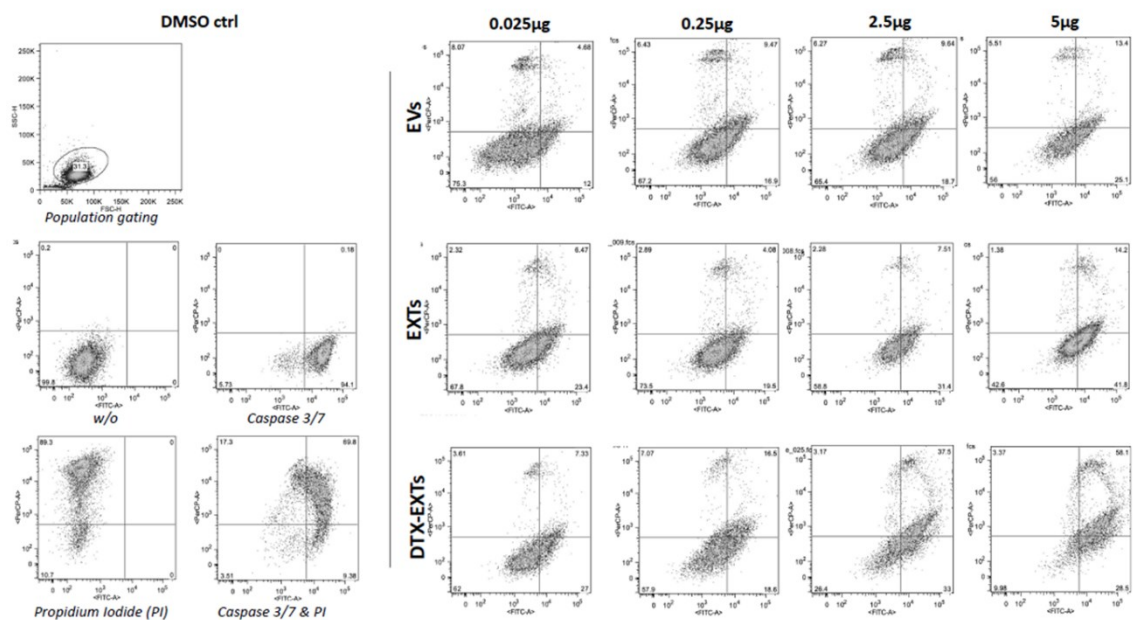


Figura 24. Selección representativa para el análisis de apoptosis. Análisis por citometría de flujo de los efectos apoptóticos en células A549. Las células fueron tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de proteínas (0.025 – 5 µg) de EVs, EXTs y DTX-EXTs, y la apoptosis fue detectada mediante tinción de caspasa 3/7 y PI. En la primera selección, la población celular fue seleccionada por FSC vs. SSC, luego se realizó la selección para PI-PerCP y caspasa 3/7-FITC. La apoptosis temprana corresponde a las células positivas para caspasa 3/7, la apoptosis tardía a las células positivas para caspasa 3/7 y

PI, y la apoptosis total es la suma de ambas. Los datos se presentan como un diagrama de puntos.

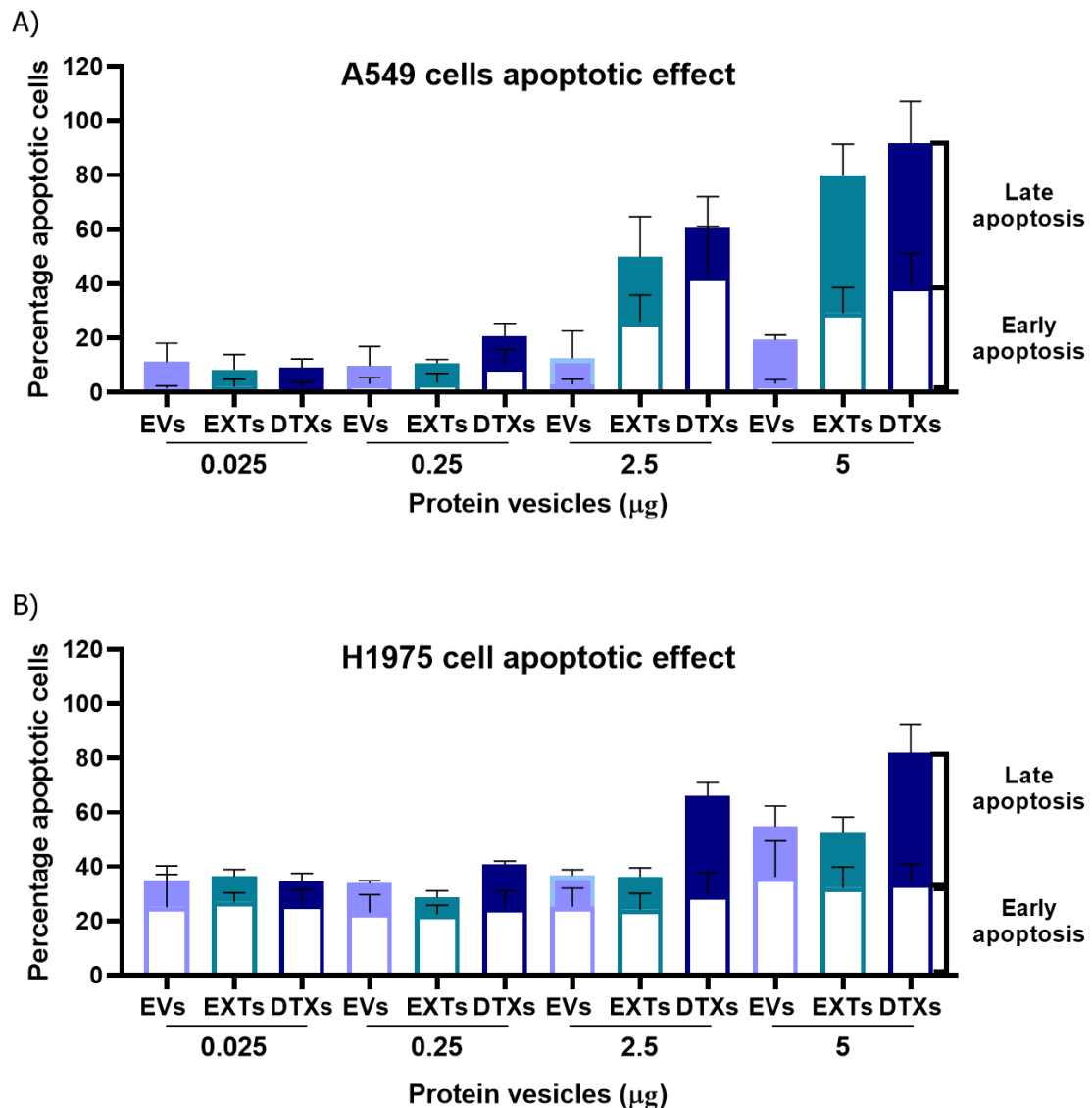


Figura 25. Efectos citotóxicos y apoptóticos de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK-92 en células de cáncer de pulmón humano.

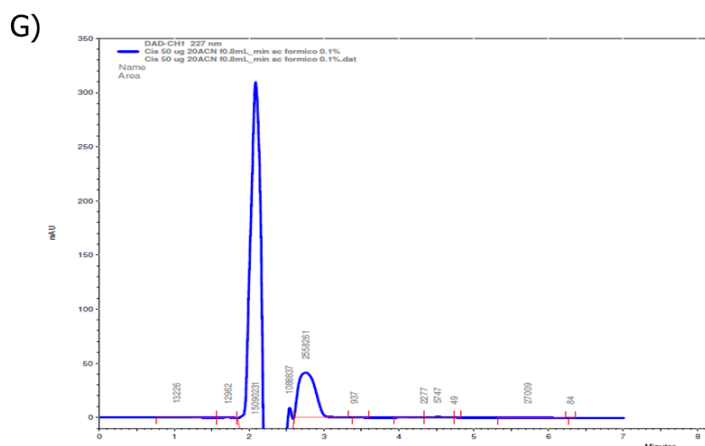
*Análisis por citometría de flujo de los efectos apoptóticos en células A549 (A) y células H1975 (B). Las células fueron tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de proteínas de EVs, EXTs y DTX-EXTs, y la apoptosis se detectó mediante tinción de caspasa 3/7 y PI. La apoptosis temprana corresponde a las células positivas para caspasa 3/7, la apoptosis tardía a las células positivas para caspasa 3/7 y PI, la suma de ambas columnas corresponde a la apoptosis total de cada tratamiento. Los datos se presentan en gráficos apilados con el valor promedio más la desviación estándar; $n=3-5$; La significancia estadística se determinó mediante ANOVA de una vía, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$.*

4.4. Cisplatino como otra alternativa de encapsulamiento farmacológico

4.4.1. Efectos citotóxicos e identificación de encapsulamiento

Se consideró el uso de cisplatino como un quimioterapéutico alternativo para su encapsulamiento en EXTs, dado su amplio uso en el tratamiento del cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer. Inicialmente, se evaluó el efecto del fármaco libre a las 48 y 72 horas en las líneas celulares H1975 y H1299. Se obtuvieron valores de IC_{50} de entre 108.2 y 39.8 μM para la línea H1975, y de 79.9 y 44.7 μM para las células H1299, a las 48 y 72 horas respectivamente (Figura 26).

Posteriormente, se intentó encapsular 100 μ g de cisplatino durante el proceso de extrusión, de manera similar al docetaxel. Sin embargo, al realizar la curva de calibración del fármaco libre, no se logró detectar la señal correspondiente a la molécula de cisplatino mediante HPLC, siguiendo el protocolo descrito previamente por Zhang y colaboradores[118], como se muestra en el cromatograma representativo (Figura 26). Ante estos resultados, se modificaron las condiciones de la fase móvil y la longitud de onda para la detección, sin obtener resultados favorables, descartándose el uso de este fármaco para el encapsulamiento en EXTs.



99

A549 y (B) células H1975 después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de cisplatino. (C) Células A549 y (D) células H1975 después de 72 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de cisplatino. Los valores de IC_{50} se determinaron a partir de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Los datos se presentan como curvas de inhibición de dosis-respuesta con regresión no lineal, mostrando el promedio y \pm SD de triplicados de 3 experimentos independientes; $n=3-4$. (E) Resumen en tabla con los valores de IC_{50} a 48 y 72 horas en células H1975 y (F) células H1299. (G) Cromatografía representativa de la determinación de la curva de calibración de cisplatino a una concentración de $50\mu g$ de cisplatino libre.

4.5. Caracterización EXT de macrófagos con polarización a fenotipo M1

4.5.1. Caracterización fenotipo M1

Para evaluar el potencial citotóxico y la capacidad de los EXTs generados a partir de células del sistema inmune como sistemas de liberación de nanofármacos, se utilizó un modelo celular basado en macrófagos con fenotipo M1. Para ello, se empleó la línea celular THP-1, derivada de monocitos humanos, los cuales fueron tratados con PMA durante 48 horas para inducir su diferenciación a macrófagos (M0). Posteriormente, se promovió la polarización hacia el fenotipo M1 mediante tratamiento con LPS. La generación del fenotipo M1 se corroboró cuantificando

las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en monocitos, macrófagos M0 y macrófagos M1 mediante ELISA, mostrando una secreción significativamente mayor en el fenotipo M1 en comparación con el fenotipo M0 (Figura 27).

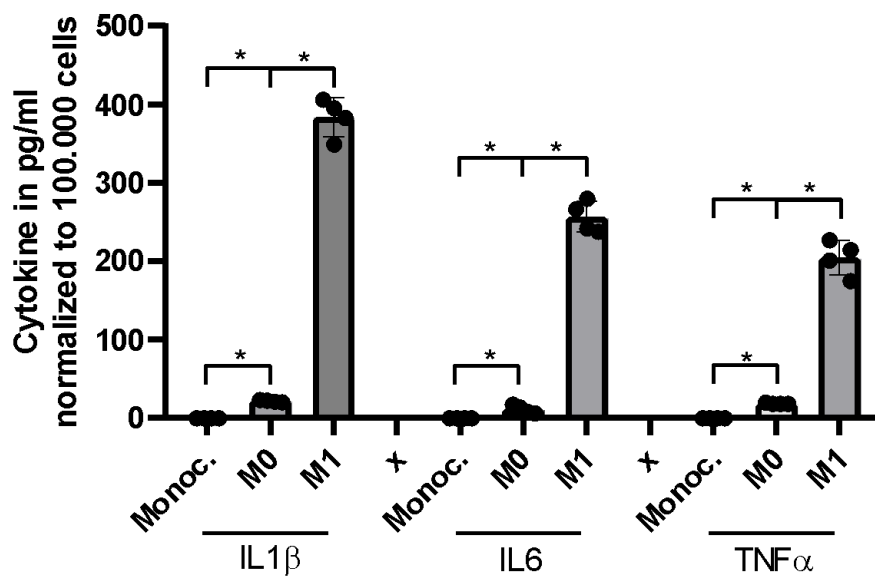


Figura 27. Análisis de ELISA de la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en monocitos, macrófagos M0 y macrófagos con polarización M1. Análisis de ELISA de la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en monocitos (células THP-1), macrófagos y macrófagos con polarización M1; N=4 experimentos independientes. La significancia estadística se evaluó con ANOVA de una vía, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.5.2. Caracterización morfológica

Los macrófagos M1 se extruyeron a través de filtros de membrana de polycarbonato (EXTs) o se extruyeron en presencia de docetaxel (DTX-EXTs) y, posteriormente, se concentraron mediante ultracentrifugación. Las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de medios condicionados sirvieron como control, al igual que lo realizado previamente para células NK-92. Para la caracterización (Figura 28), se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) y reveló estructuras vesiculares redondeadas, bien definidas y cerradas en todos los grupos con la clásica morfología de forma de copa, esperado para este tipo de vesículas. Todas las poblaciones de vesículas mostraron tamaños dentro del rango esperado para EVs (cercano y menos a 200 nm).

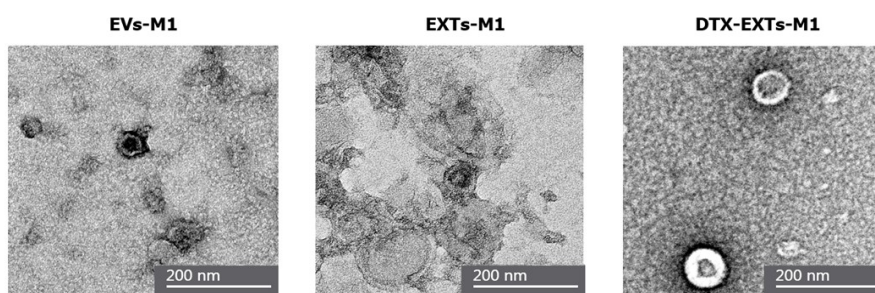


Figura 28. Caracterización morfológica de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1. Imágenes representativas de EVs-M1, EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1 mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), escala 200 nm; n=3.

4.5.3. Cuantificación, perfiles de distribución de tamaño y rendimientos.

Los hallazgos morfológicos fueron corroborados por el análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA), que demostró tamaños modales de 169.1 ± 41.7 nm, 144.8 ± 4.1 nm y 146.6 ± 12.3 nm para EVs-M1, EXT-M1 y DTX-EXTs-M1, respectivamente (Figura 29). No se observó una variación de tamaños entre los grupos de vesículas como en el caso de las generadas previamente por células NK. Todas las muestras presentaron distribuciones polimodales, con el peak en la mayor concentración a tamaños menores de 200 nm.

El rendimiento de producción de EXTs y DTX-EXTs se evaluó cuantificando el número de partículas y la concentración de proteínas normalizadas por 1×10^6 células. Todos los grupos de vesículas presentaron concentraciones del orden 1×10^{10} vesículas/mL. Los EXTs-M1 exhibieron un aumento de 11.7 veces en el número de partículas en comparación con las EVs-M1. Al mismo tiempo, las DTX-EXTs-M1 mostraron un aumento de 35.2 veces en relación con las EVs y un aumento de 1.75 veces en comparación con las EXTs (Figura 29). Todas estas diferencias no presentaron significancia estadística.

Por otro lado, los rendimientos de producción de vesículas en base a la cantidad de proteínas normalizadas por 1×10^6 células mostró que los EXTs-M1 exhibieron un aumento de 16.9 veces en cantidad de proteínas en comparación con las EVs-M1. Al mismo tiempo, las DTX-EXTs-M1 mostraron un aumento de 16.4 veces en relación con las EVs y no mostraron un aumento en comparación a los EXTs, al contrario, se observó una reducción en la cantidad de proteínas del 3.05%. Todas estas diferencias no presentaron significancia estadística.

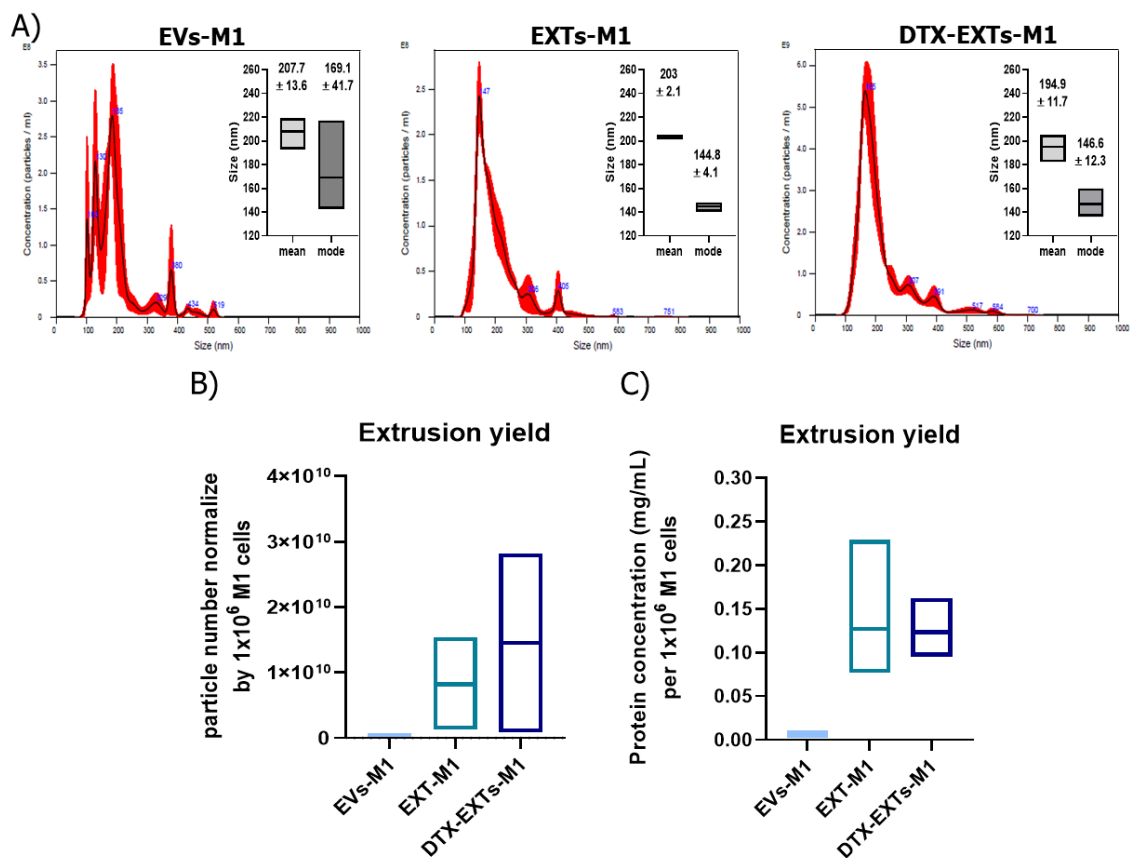


Figura 29. Análisis de perfiles de distribución poblacional y rendimiento de aislamiento de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1. (A) Distribución de tamaño y concentración de partículas mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA); N=3; (B) Rendimiento de la concentración total de partículas determinado por NTA; n=3; (C) Rendimiento de la concentración total de proteínas determinado por ensayo BCA; n=4-5; Los datos se presentan como diagramas de caja con valores mínimos, máximos y promedio. La significancia estadística se evaluó con la prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples y la prueba post-hoc de Dunn. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para determinar la normalidad de la distribución de los datos, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.5.4. Determinación Encapsulamiento de Docetaxel

La eficiencia de encapsulación de DTX se realizó de manera indirecta (%IEE), para esto se recolectaron muestras de la dilución de los DTX-EXTs-M1 previo al aislamiento por ultracentrifugación y del sobrenadante posterior al aislamiento, obteniendo una concentración inicial (C_i) y final (C_f) del %IEE (Figura 30).

La identificación y cuantificación de DTX se basaron en el tiempo de retención y el área del peak del cromatograma de la C_i y C_f como se observa en los cromatogramas representativos ilustra la detección de DTX a un tiempo de

retención de aproximadamente 4.18 min, distinto del peak del disolvente DMSO (1.8-2.5 min). Se generó una curva de calibración lineal para DTX en el rango de 0.625-100 µg/mL ($R^2 = 0.99$; $y = 638024X + 319512$). El %IEE calculado fue de $71.57 \pm 41.2\%$, siendo 54.6 veces superior a lo obtenido previamente en DTX-EXT-NK.

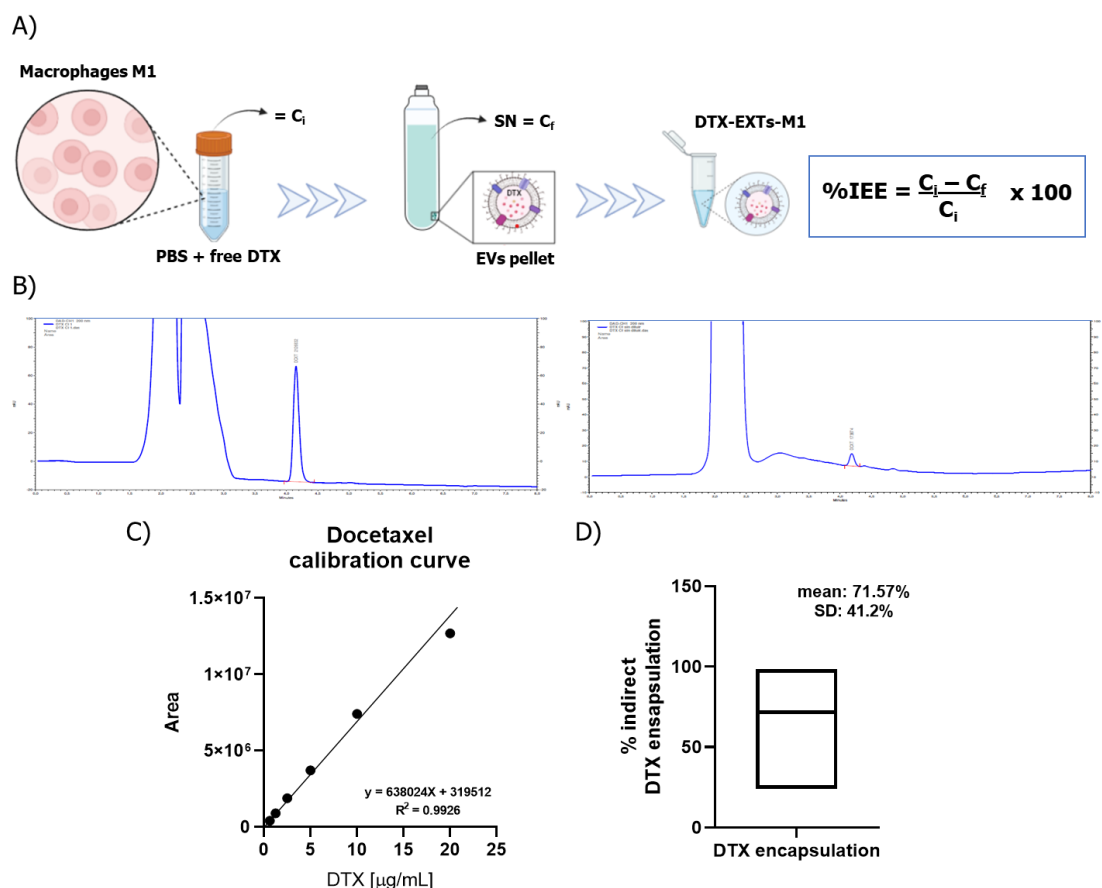


Figura 30. Porcentaje de eficiencia de encapsulación indirecta de docetaxel en DTX-EXTs-M1. (A) Flujo de trabajo para la determinación indirecta de docetaxel en DTX-EXTs-M1 mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (B) Cromatografía representativa de la determinación de docetaxel en

muestras antes y después de la separación por ultracentrifugación (C) Curva de calibración de la determinación de docetaxel libre. Los datos se presentan en un gráfico lineal. (D) Porcentaje de encapsulación de docetaxel en DTX-EXTs-M1. Los datos se presentan como diagramas de caja con valores mínimos, máximos y promedio; n=3.

4.5.5. Mecanismos de internalización de Extrusomas de macrófagos

M1

De manera preliminar, se investigaron los mecanismos subyacentes en la captación de vesículas derivadas de macrófagos M1. Para ello, se pretrataron las células H1975 con diferentes inhibidores: clorpromazina, amilorida, omeprazol y fillipin III, dirigidos a bloquear la endocitosis mediada por clatrina, la macropinocitosis, la fusión de membranas y la endocitosis mediada por caveolas, respectivamente. Este enfoque fue similar al utilizado en estudios con EXTs derivadas de células NK (Figura 31).

Los resultados sugieren que la endocitosis mediada por caveolas no está involucrada en la internalización de ninguno de los tres tipos de vesículas evaluadas (EVs-M1, EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1), ya que no se observó inhibición significativa en presencia de fillipin III. Por otro lado, los EVs-M1 mostraron la

mayor susceptibilidad a la inhibición de los mecanismos de internalización evaluados, en contraste con los EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1, que solo presentaron una disminución en su internalización en presencia de clorpromazina, lo que sugiere que estos tipos de vesículas dependen principalmente de la endocitosis mediada por clatrina (Figura 31).

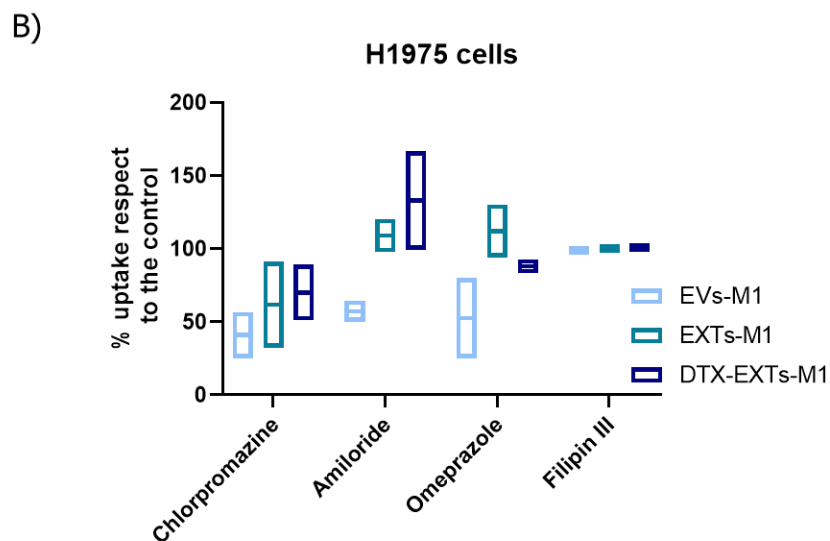
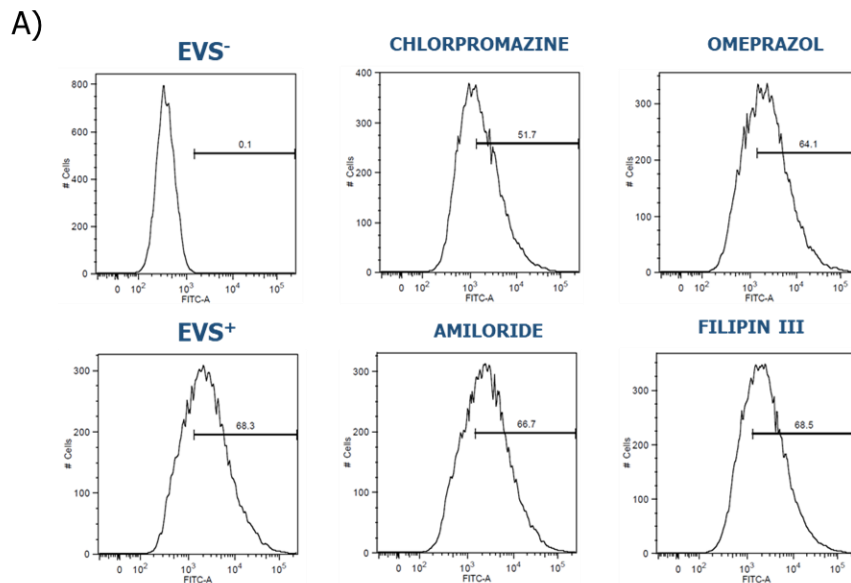


Figura 31. Mecanismos de internalización de EVs, EXTs y DTX-EXTs del fenotipo M1 de macrófagos en células de cáncer de pulmón humano. (A) *Análisis representativo por citometría de flujo de los efectos de inhibición de la captación en células H1975. En el primer gating, la población celular fue seleccionada mediante FSC vs. SSC, luego se realizó el gating para vesículas-CFSE-FIT-C. Las células sin vesículas fueron el control negativo y las células con vesículas fueron el control positivo. Los datos se presentan en un histograma.* (B) *Análisis cuantitativo por citometría de flujo de la inhibición de la captación de EVs-M1, EXTs-M1 y DTX-EXT-M1 en células H1975, utilizando clorpromazina, amilorida, omeprazol y fillipin III como inhibidores. Los datos se presentan en gráficos de cajas con valores mínimos, máximos y medios; n=2.*

4.5.6. Efectos citotóxicos

4.5.6.1. Ensayo de MTT

Inicialmente, se evaluó el efecto del fármaco libre a las 48 en las líneas celulares H1975 y H1299. Se obtuvieron valores de IC_{50} de entre 21.13 ± 1.91 nM para la línea H1975, y de 20.73 ± 8.90 nM para las células H1299.

La citotoxicidad mediada por vesículas fue evaluada utilizando el ensayo de MTT tras 48 horas de tratamiento con concentraciones de proteínas de 2.5 y 5 μ g/pocillo en las líneas celulares H1975 y H1299. Los resultados mostraron que

las DTX-EXTs generaron una citotoxicidad mayor que los EVs en ambas concentraciones evaluadas, induciendo una disminución de la viabilidad celular cercana al 50% en ambas líneas. Por otro lado, los EXTs mostraron una citotoxicidad mayor que los EVs solo a la concentración más alta, lo que sugiere una mayor sensibilidad celular en este caso. Sin embargo, no se observó una clara relación dosis-respuesta, y solo se evidenció una tendencia no significativa hacia un aumento de la citotoxicidad a concentraciones más altas (Figura 32).

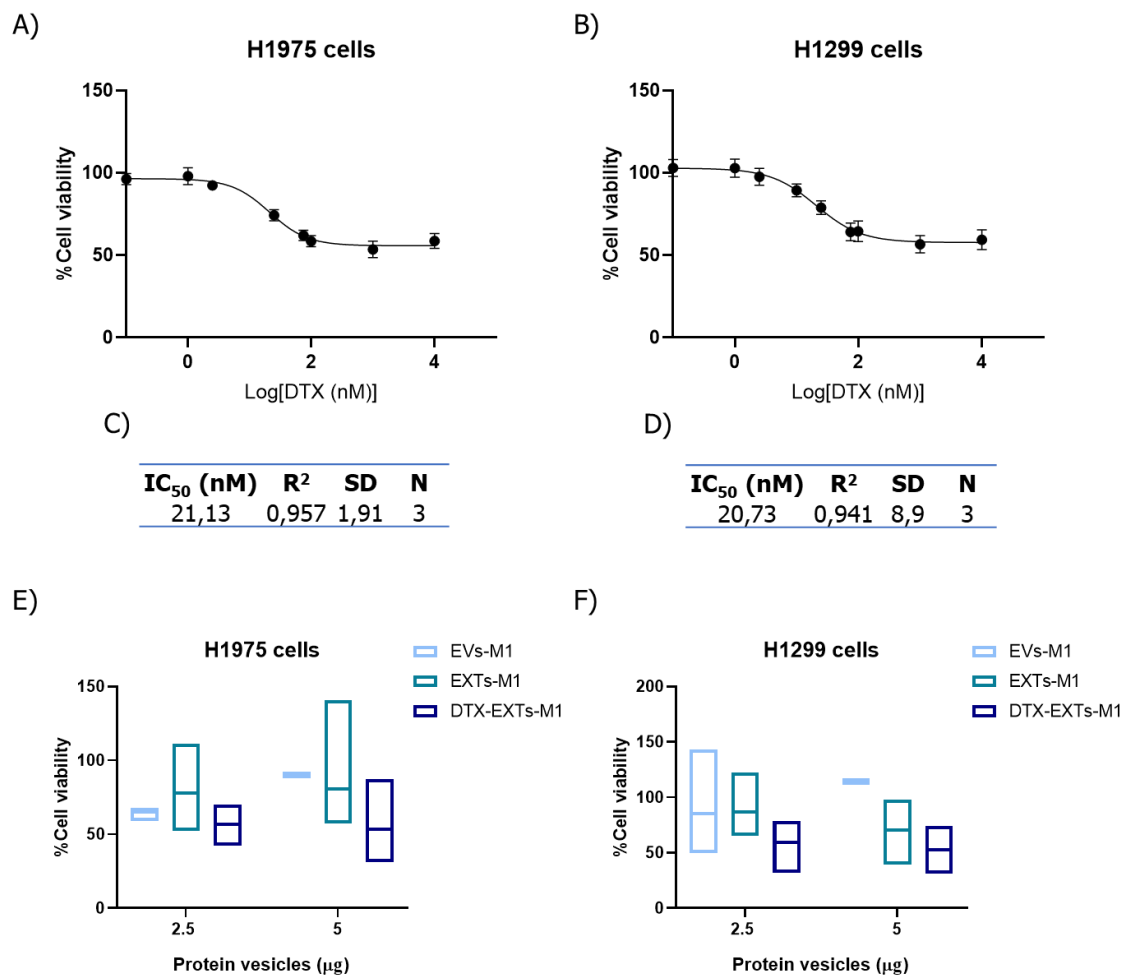


Figura 32. Efecto citotóxico de EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de macrófagos con fenotipo M1 en células de cáncer de pulmón humano. (A) Células H1975 y (B) células H1299 después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de docetaxel. Los valores de IC_{50} fueron determinados a partir de la viabilidad celular medida mediante el ensayo MTT. Los datos se presentan como curvas de inhibición dosis-respuesta ajustadas por regresión no lineal, con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. (C) Resumen en tabla con los valores de IC_{50} a las 48 horas en células H1975 y (D) células H1299. (E/F) Efectos citotóxicos en células H1975 (E) y células H1299 (F) después de 48 horas de tratamiento con concentraciones crecientes de proteínas de EVs-M1, EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1, determinados mediante el ensayo MTT. $n=3$.

4.6. Proyecciones en aplicación de tratamientos a cultivos esferoidales

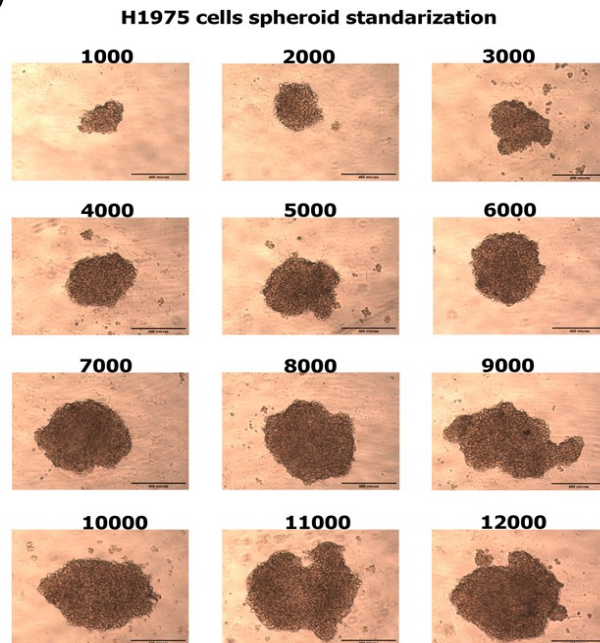
4.6.1. Estandarización de condiciones para cultivos 3D de carcinoma pulmonar

Como proyección futura en el uso de nanoformulaciones con docetaxel encapsulado en vesículas artificiales derivadas de células, es crucial que estas sean capaces de eliminar subpoblaciones celulares resistentes a los tratamientos convencionales. Con este objetivo, se estandarizaron las condiciones para

generar cultivos tridimensionales (3D) de las líneas celulares H1975 y H1299, que imitan mejor las condiciones tumorales *in vivo*. Se recubrieron pocillos de placas de 96 pocillos con una película de Poli-(HEMA), creando un entorno de cultivo libre de adherencia. A continuación, se sembraron cantidades crecientes de células (Figura 33Figura 34), y se midieron el área y los diámetros de los esferoides a las 24, 48, 72 y 96 horas. Las condiciones seleccionadas generaron esferoides con diámetros entre 100 y 500 micras, que fueron las consideradas óptimas para el análisis.

Se observó que, en ambas líneas celulares, la siembra de 1×10^3 células por pocillo producía esferoides que cumplían con las especificaciones mencionadas. Un hallazgo interesante fue el comportamiento diferencial en el crecimiento de las dos líneas celulares a lo largo del tiempo. La línea H1975 mostró un crecimiento sostenido, evidenciado por el aumento progresivo en el diámetro y área de los esferoides (Figura 35). En cambio, la línea H1299 no presentó crecimiento durante las primeras 72 horas, pero a las 96 horas se observó un aumento drástico, duplicando su diámetro y triplicando su área (Figura 36). Estos resultados destacan la variabilidad en el comportamiento de las líneas celulares y subrayan la importancia de estudiar su respuesta a las nanoformulaciones en un contexto tridimensional.

A)



B)

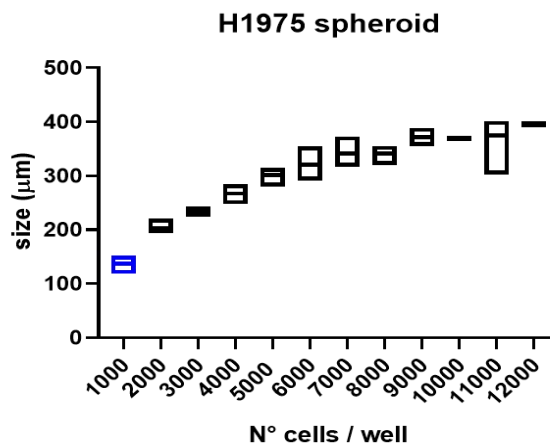
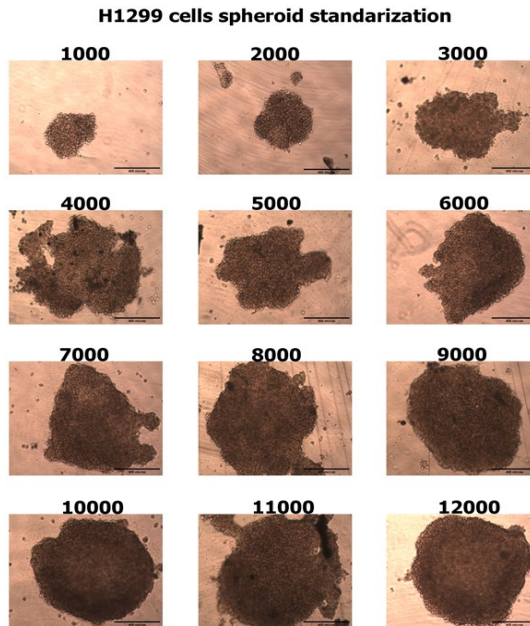


Figura 33. Estandarización para la generación de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón. (A) Microfotografía representativa de la formación de esferoides de la línea celular H1975 con concentraciones crecientes

de células por pocillo (1000 – 12000 células). (B) Análisis cuantitativo del tamaño de los esferoides en cada condición de cultivo (micras); la barra azul indica la condición seleccionada para experimentos posteriores. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en tres experimentos independientes. La escala es de 400 μm .

A)



B)

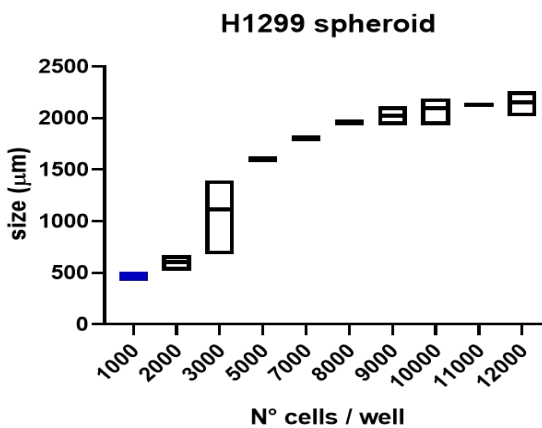


Figura 34. Estandarización para la generación de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón. (A) Microfotografía representativa de la formación de esferoides de la línea celular H1299 con concentraciones crecientes de células por pocillo (1000 – 12000 células). (B) Análisis cuantitativo del tamaño de los esferoides en cada condición de cultivo (micras); la barra azul indica la

condición seleccionada para experimentos posteriores. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en tres experimentos independientes. La escala es de 400 μm .

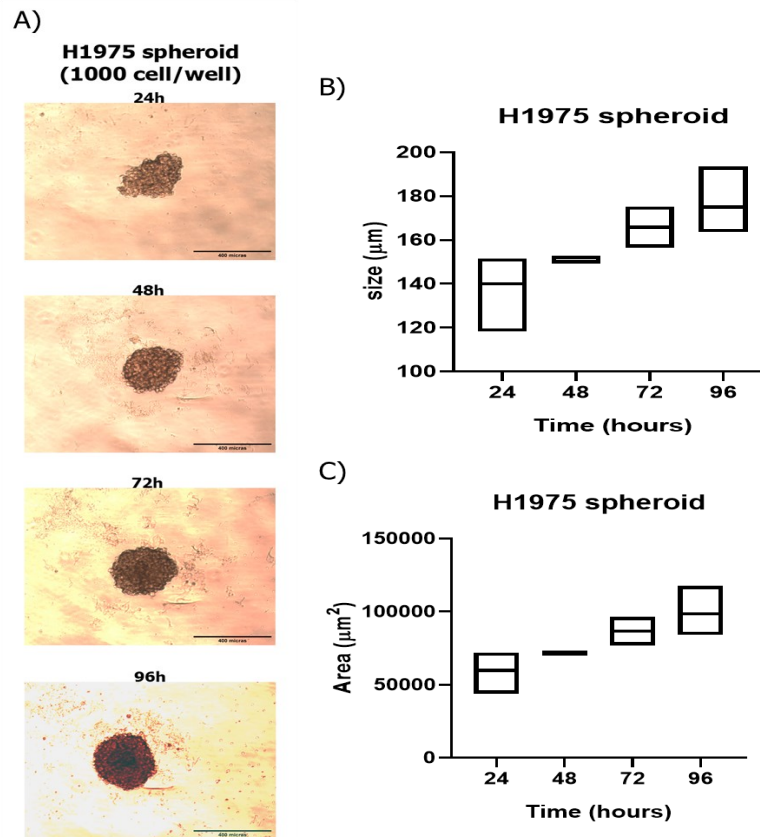


Figura 35 Evaluación del crecimiento de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón. (A) Microfotografía representativa del crecimiento de esferoides de 24 a 96 horas de la línea celular H1975. (B) Cuantificación del tamaño y (C) diámetro de los esferoides a las 24, 48, 72 y 96 horas de crecimiento. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en tres experimentos independientes. La escala es de 400 μm .

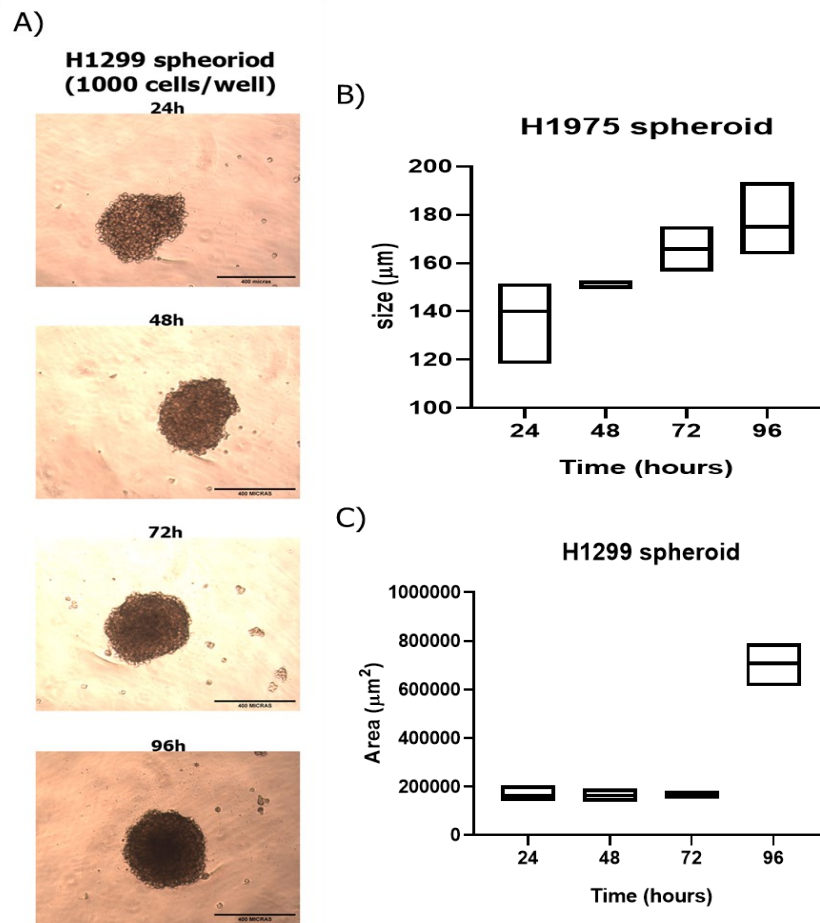


Figura 36. Evaluación del crecimiento de cultivos esferoidales de líneas celulares de cáncer de pulmón. (A) Microfotografía representativa del crecimiento de esferoides de 24 a 96 horas de la línea celular H1299. (B) Cuantificación del tamaño y (C) diámetro de los esferoides a las 24, 48, 72 y 96 horas de crecimiento. Los experimentos se realizaron por quintuplicado en tres experimentos independientes. La escala es de 400 μm .

DISCUSIÓN

Las terapias contra el cáncer basadas en células presentan varios desafíos, como la capacidad de infiltrarse en los tumores[121], los prolongados tiempos de activación y expansión celular *ex vivo*[122]. o los pacientes no respondedores[117], entre otros. Por lo tanto, los productos celulares como las vesículas extracelulares derivadas de células inmunes pueden ser alternativas atractivas, ya que pueden superar varias limitaciones de las terapias celulares, como la infiltración tumoral y la durabilidad[123]. Además, pueden actuar como sistemas de administración de fármacos y ofrecer una amplia gama de opciones para modificaciones y carga de fármacos[124]. Las NK-EVs presentan otra ventaja, ya que transportan proteínas y miARN asociados con la citotoxicidad tumoral[121]. En los últimos años, se ha puesto un énfasis particular en la generación artificial de vesículas a partir de células[108]. Las vesículas artificiales, como los extrusomas y los liposomas, combinan las ventajas mencionadas de las vesículas extracelulares con la conservación de todas las biomoléculas presentes en la célula, lo que puede aumentar su eficacia antitumoral[110,114].

En el presente trabajo, somos los primeros en reportar la encapsulación de docetaxel en vesículas artificiales mediante extrusión (EXT). El docetaxel es un

quimioterápico de primera línea que se utiliza como agente único o coadyuvante en varios tipos de cáncer con efectos notables[125], incluido el CNCP[126]. Sin embargo, presenta varias limitaciones importantes, como efectos adversos y baja solubilidad en agua y resistencias. Su naturaleza lipofílica requiere que las formulaciones comerciales contengan polisorbato 80, un tensioactivo no iónico y emulsionante[33,127]. El polisorbato 80 se consideraba un compuesto inerte, pero recientemente se ha asociado con reacciones alérgicas[128]. Estas limitaciones motivan la investigación para mejorar los vehículos de administración y aumentar la eficacia de la entrega para reducir las dosis de docetaxel para los pacientes y evitar la generación de mecanismos de resistencia.

En este estudio, diseñamos un protocolo para aislar EXTs de células NK e incorporar el fármaco quimioterapéutico docetaxel (DTX-EXTs) durante el proceso de extrusión. Utilizando nuestro protocolo, EXTs y DTX-EXTs exhibieron, en promedio, un mayor rendimiento de partículas y proteínas que los EVs, similar a estudios previos sobre extrusomas de NK. Sin embargo, el contenido de proteínas fue menor que el observado por Zhu et al., y el rendimiento de partículas fue ligeramente superior[114]. Los tres grupos demostraron una morfología de vesícula conservada y estaban dentro del tamaño esperado para los EVs, aunque se observó un aumento de 81 nm en el tamaño promedio de los DTX-EXTs en comparación con los EXTs (Figura 12

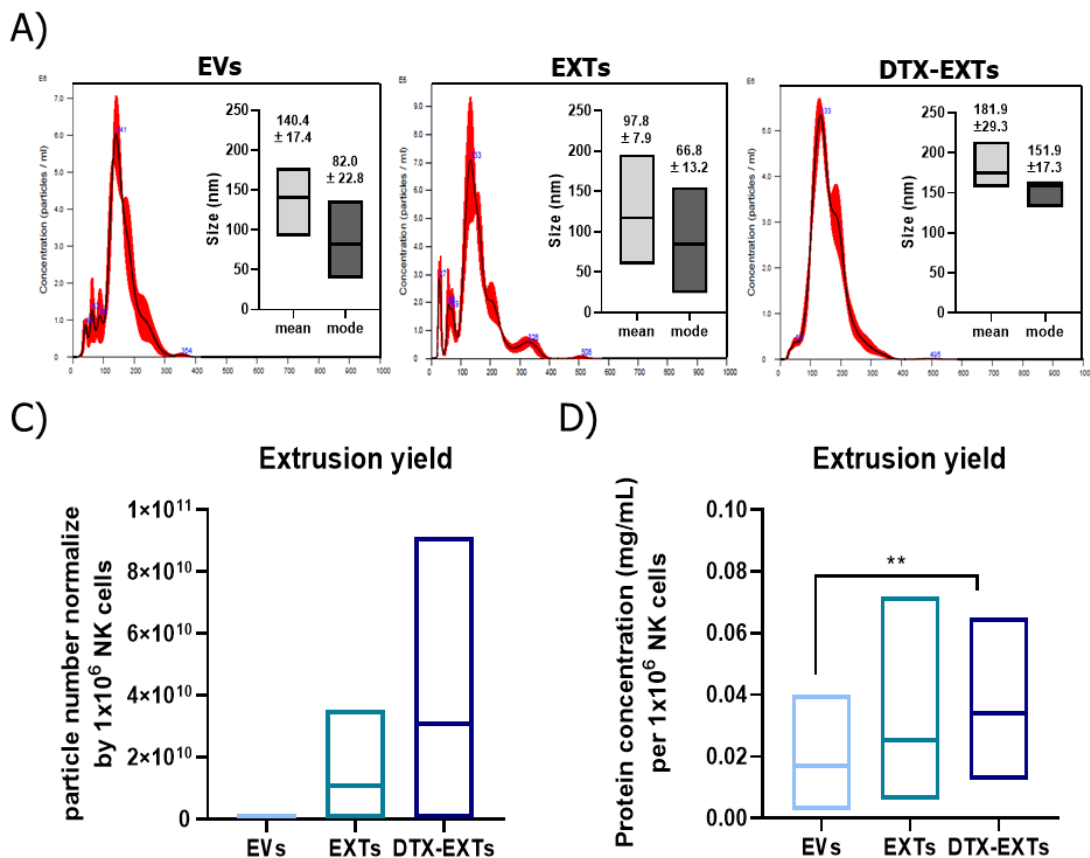


Figura 14). Se sabe que el DTX se incorpora a las membranas lipídicas (principalmente en grupos de 2 moléculas de DTX, aunque también se han observado 3-4 moléculas), interactuando con la cadena acilo de los fosfolípidos[129]. Los EXT-DTXs se crean fraccionando la membrana celular en partes más pequeñas para que estas partes puedan transformarse en formas energéticamente favorables (estructuras tipo liposoma)[130,131]. Por lo tanto, la integración de DTX en las membranas lipídicas puede cambiar la curvatura de la estructura tipo liposoma. Curiosamente, la cuantificación de fosfolípidos totales reveló que solo los EXTs mostraron un contenido de fosfolípidos

significativamente mayor que los EVs. Para los DTX-EXTs, con un mayor rendimiento de partículas y un tamaño más grande, se esperaba un contenido de fosfolípidos mayor que los EVs y EXTs. Sin embargo, se observó que era menor que en los EXTs, lo que indica una mayor integración de DTX en la membrana de los DTX-EXTs. La cuantificación de DTX indica que aproximadamente 140.6 ± 91.2 pM de DTX se están integrando en 10 μ g de EXTs (Figura 17). Esto confirma lo que han informado otros autores, sobre las limitaciones de encapsular una molécula con las propiedades lipofílicas del DTX [132]..

El análisis del contenido de proteínas de las diferentes vesículas de células NK mediante Western blotting (Figura 15) mostró que los EXTs estaban enriquecidos en perforina y FasL en comparación con informes previos de Zhu et al.[114] , lo que sugiere un mayor potencial citotóxico. El análisis proteómico reveló diferencias sustanciales en la composición de proteínas entre los tipos de vesículas, con EXTs y DTX-EXTs exhibiendo un perfil proteico compartido y único.

En primer lugar, se observó que las muestras de EVs presentan una mayor variabilidad respecto a los EXTs y DTX-EXTs que se agruparon en conjunto en el análisis de componente principal (Figura 18).

Se identificaron 2,423 proteínas comunes en los tres grupos de vesículas estudiados. Sin embargo, se observaron 81 proteínas exclusivas de las EVs, 84 en las EXTs y 95 en las DTX-EXTs. (Figura 18)

Entre las EVs, destaca la presencia de la CDH13, también conocida como T-caderina, una proteína que actúa como supresor tumoral regulando la adhesión celular. Su baja expresión en células tumorales ha sido asociada con un aumento del crecimiento tumoral y la metástasis[133]. Además, se detectó la proteína inducida por el factor de crecimiento transformante β Ig-h3 (TGFB1), una proteína de la matriz extracelular con función de supresor tumoral. Su expresión aumentada ha demostrado inducir la muerte celular en el cáncer de ovario[134]. En las EXTs, la presencia de IRF3, un factor de transcripción clave en la respuesta inmune innata, es notable. La disminución de su expresión se ha relacionado con una mayor proliferación celular en modelos como el cáncer colorrectal, sugiriendo que su regulación podría ser crítica en la inmunovigilancia contra el cáncer[135]. Finalmente, en los DTX-EXTs, destaca la IFI30, una proteína cuya sobreexpresión ha sido asociada con procesos tumorales y resistencia a quimioterapias. Esto sugiere que su presencia en las vesículas podría influir negativamente en la respuesta tumoral a los tratamientos[135].

La presencia de estas proteínas en las vesículas extracelulares es de suma importancia, ya que podrían ejercer un rol dual en las células receptoras, resaltando la complejidad de las interacciones.

Los volcano plots permitieron identificar de manera clara las proteínas diferencialmente abundantes entre los EVs, EXTs y DTX-EXTs (Figura 19). Las comparaciones entre EVs y los otros grupos mostraron un mayor número de proteínas con diferencias significativas en su expresión. En contraste, la comparación entre EXTs y DTX-EXTs reveló un conjunto más reducido de proteínas diferenciadas (solo 40 proteínas). Entre las proteínas de interés común a todas las comparaciones, destaca el receptor A3 similar a la inmunoglobulina leucocitaria (LILRA3), conocido por su papel en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y su asociación con la supresión tumoral, sugiere una posible función de los DTX-EXTs en la modulación de la respuesta inmune[136].

Notablemente, tanto los receptores de células NK como las proteínas de gránulos citolíticos eran altamente abundantes en la carga de EXTs y DTX-EXTs. Entre las proteínas receptoras de células NK, el receptor de baja afinidad de la región Fc de la inmunoglobulina gamma III-A (FCGR3A) fue el más prevalente en el grupo EV, un hallazgo significativo dado su papel en la mediación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos tras la activación[137]. Además, entre todas las proteínas marcadoras de EV, el CD82 se encontró en la mayor

abundancia dentro de los EVs. Esta observación corrobora los hallazgos de estudios previos[138,139]. Nuestros hallazgos sugieren que la extrusión altera el proteoma de las vesículas, lo que potencialmente impacta sus propiedades funcionales (Figura 20).

Estudios previos han reportado la internalización exitosa de EXTs de diversas fuentes, similar a las EVs, en periodos de 3-24 horas[114,140,141]. Sin embargo, somos los primeros en analizar la ruta de internalización, que es clave para entender los efectos posteriores que las vesículas pueden tener en las células. Las cuatro rutas principales incluyen: i) la endocitosis mediada por clatrina, donde las vesículas se transportan al lisosoma para su degradación; ii) la endocitosis mediada por caveolina o balsas lipídicas, donde las vesículas se transportan hacia el aparato de Golgi y la carga se libera en el citoplasma; iii) la macropinocitosis, un proceso inespecífico donde las vesículas se transportan al lisosoma para su degradación o se liberan en el citoplasma; iv) la fusión de membrana, donde las vesículas se fusionan e integran en la membrana de la célula objetivo, liberando la carga en el citoplasma[78]. Para las células A549, se observaron dos mecanismos principales de internalización de vesículas: la endocitosis dependiente de clatrina y la fusión de membrana, con una participación menor de las balsas lipídicas y la macropinocitosis. Curiosamente, en general, se observaron patrones similares para EVs, EXTs y DTX-EXTs,

excepto en la macropinocitosis, donde EXTs y DTX-EXTs mostraron un patrón diferente en comparación con EVs (Figura 21). El principal mecanismo para H1975 fue la endocitosis dependiente de clatrina, con la fillipin III promoviendo significativamente la captación de vesículas (Figura 22). La diferencia en la internalización de vesículas entre los tipos de células es digna de mención, ya que brinda información importante para comprender los mecanismos de acción posteriores. Como se mencionó anteriormente, las células H1975 son CNCP, mientras que las A549 son células de adenocarcinoma. Las células H1975 sobreexpresan el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR)[142], que se encuentra principalmente alrededor de las balsas lipídicas. Se ha descrito que las membranas celulares que son ricas en balsas lipídicas son menos fluidas, debido a la mayor cantidad de colesterol, esfingolípidos y gangliósidos.[143,144]. Esto puede tener varios efectos: por un lado, una membrana menos fluida puede ser menos susceptible a la fusión de membrana. Por otro lado, se observó un aumento significativo en la captación de vesículas con el agente bloqueador de colesterol fillipin III. EGFR, las balsas lipídicas y la endocitosis mediada por clatrina están estrechamente interconectados. La interrupción de las balsas lipídicas en una célula que sobreexpresa EGFR, podría en realidad aumentar la endocitosis mediada por clatrina y conducir a una tasa general de captación más alta[145,146].

Se evaluaron la viabilidad celular y la apoptosis tras el tratamiento con diferentes concentraciones de EVs de células NK, EXTs y DTX-EXTs en ambas líneas celulares. La apoptosis se midió con Caspasa 3/7 y PI, permitiendo diferenciar entre apoptosis temprana y tardía. En la línea celular de adenocarcinoma A549, los EXTs y DTX-EXTs tuvieron un efecto significativamente mayor que los EVs a la concentración de 5 μg , observado en la apoptosis temprana, tardía y total. Los DTX-EXTs produjeron significativamente más apoptosis que los EXTs (Figura 25). En todas las concentraciones, los EXTs y DTX-EXTs mostraron una menor viabilidad celular que los EVs. Se identificó TNFRSF10B en ambos, EXTs y DTX-EXTs. Informes previos sugieren que los tratamientos que elevan TNFRSF10B pueden inducir apoptosis y causar arresto del ciclo celular en CNCP[147]. Para las células H1975 de CNCP, no se observaron diferencias entre los grupos en la viabilidad celular y apoptosis temprana. Sin embargo, los DTX-EXTs mostraron una tasa significativamente mayor de apoptosis tardía y total a 2.5 μg y 5 μg , lo que indica que el tratamiento con DTX-EXTs induce un daño más rápido en las células H1975 con menor impacto en su viabilidad(Figura 25).

Es notable el efecto del DTX administrado con extrusomas: para las células H1975, la concentración IC_{50} de DTX es de 21.3 nM, y para las células A549, de 8.86 nM. El DTX administrado dentro de vesículas es de 70 pM para la concentración de vesícula de 5 μg y 35 pM para la concentración de vesícula de

2.5 μg , entre 300 a 600 veces menor que el DTX libre. Estudios previos han mostrado que el DTX puede aumentar la permeabilidad de la membrana lisosomal y, posteriormente, afectar a las mitocondrias[148]. En los DTX-EXT solo se encontró otra proteína potencialmente citotóxica, la Peptidasa Caseinolítica P, que tiene la capacidad de afectar la actividad mitocondrial al reducir el metabolismo oxidativo e inducir disfunción mitocondrial[149].

Nuestro estudio mostró que la principal vía involucrada en la captación de vesículas para ambos tipos celulares es la endocitosis dependiente de clatrina, que transporta las vesículas al lisosoma. El transporte directo de los DTX-EXTs al lisosoma aparentemente conduce a un efecto de "caballo de Troya", aumentando el efecto tanto de los EXTs como del DTX.

El CIS por otro lado, Se consideró como una alternativa de quimioterapéutico para el encapsulamiento en EXTs debido a que es un agente quimioterapéutico ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluido el CP, debido a su capacidad para inducir la apoptosis a través de la formación de aductos intracadena en el ADN. No obstante, la eficacia del CIS en su forma libre está limitada por efectos secundarios debido a su toxicidad sistémica y resistencia adquirida en algunas líneas celulares de cáncer, lo que motiva la búsqueda de sistemas de liberación más eficientes, como el encapsulamiento en vesículas extracelulares[150–152].

Los valores de IC_{50} obtenidos en las líneas celulares H1975 y H1299 muestran que el CIS libre tiene mayor potencia citotóxica en células H1299, en comparación con H1975, lo que sugiere mayor sensibilidad (Figura 26). Esto es coherente con estudios previos que indican que diferentes líneas celulares de CP pueden tener respuestas variables a los quimioterapéuticos dependiendo de su perfil genético y molecular como se detalla en la Tabla 2[153,154].

Por ejemplo, las células H1975 además de la mutación en el gen EGFR, que aumenta la actividad quinasa del EGFR, promoviendo la activación continua de vías de señalización como PI3K/Akt y RAS/RAF/MEK/ERK. Promoviendo la sobrevida y resistencia a la apoptosis, lo que dificulta la efectividad del CIS. También presenta mayor expresión de proteínas de reparación del ADN (proteína NER) lo que le permite mayor capacidad reparativa del ADN, a diferencia de las células H1299 que las hace más sensible al tratamiento con CIS[155].

Aunque el protocolo seguido fue el propuesto por Zhang y colaboradores[118], la técnica HPLC puede no haber sido la óptima para la detección del cisplatino encapsulado, lo que sugiere que una optimización más exhaustiva de los parámetros podría haber ayudado a su determinación, aunque análisis comparativos para la determinación de quimioterapéuticos en base a platino indicaron que la LC-MS/MS presentó mejores características analíticas (Figura 26)[156].

Aunque como se ha mencionado anteriormente, las células NK son las únicas en ejercer su función antitumoral sin activación previa, resulta importante evaluar el rol que pueden tener otras células del sistema inmune como lo son los macrófagos con polarización a fenotipo M1 para la generación de vesículas artificiales derivadas de estas células, ya que en primer lugar, la inmunovigilancia *in vivo* funciona como respuestas orquestadas en donde todas las células inmune interaccionan, e influyen unas en otras para lograr la ejecución de su función especializada[157].

Por otro lado, los macrófagos con fenotipo M1 son capaces de secretar altas cantidades de citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Figura 27). Estas citoquinas pueden activar y reclutar otras células inmunes al microambiente tumoral, potenciando así la respuesta inmunitaria contra las células cancerosas[158]. Adicionalmente pueden inducir apoptosis en células tumorales mediante la producción de óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS)[159]. Además, pueden hacer presentación antigénica a linfocitos T, promoviendo la activación de la respuesta inmune adaptativa[160].

Como también, los macrófagos M1 pueden contribuir a la inhibición de la angiogénesis al secretar factores que limitan el crecimiento de vasos sanguíneos en el tumor[161].

Los EVs-M1, EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1, presentaron morfologías de vesículas con forma de copa, con membrana íntegra y tamaños menores a 200 nm (Figura 28), observándose un tamaño promedio 4.7 y 12.8 nm menor en los EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1 en comparación a los EVs-M1, respectivamente (Figura 29). Y aunque se observaron mayores rendimientos en el aislamiento de, EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1 en comparación a los EVs-M1, estos no fueron significativos. Interesante es el resultado al comparar los rendimientos entre las vesículas derivadas de células NK y de macrófagos M1, ya que las primeras presentaron 5.5 veces mayor rendimiento en cuanto al número de vesículas, pero 5.9 veces menor rendimiento en cantidad de proteínas. Esto podría estar relacionado directamente con que los EXTs-M1 son casi el doble en tamaño que los EXTs-NK (203 ± 2.1 nm vs 97.8 ± 7.9 nm), lo que podría sugerir que hay menos número de vesículas pero de mayor tamaño y en consecuencia, mayor abundancia de proteínas en el cargo cuando son normalizadas por 1×10^6 células en ambos casos (Figura 29).

La eficiencia de encapsulación de DTX en DTX-EXTs-M1 se midió indirectamente al evaluar los sobrenadantes antes y después del aislamiento, a diferencia de lo realizado en DTX-EXTs-NK, en donde se midió directamente en las vesículas. Esto sugiere que la metodología de medición podría estar influyendo en los %EE. En el caso de las EXTs-M1, el valor del $71.57 \pm 41.2\%$ podría estar afectado por

la cantidad de DTX libre que no fue encapsulado, lo que podría llevar a una sobreestimación de la %EE, sobre todo considerando que previamente se ha reportado que la determinación directa de docetaxel en exosomas de macrófagos ha sido entre el 15 y 17%[132]. Mientras que la medición directa en EXTs-NK, aunque resultó en un bajo porcentaje de encapsulación del $1.31 \pm 1.17\%$, proporciona un valor más específico sobre la cantidad de DTX que realmente está presente en las vesículas (Figura 30). Por otro lado, la composición de las vesículas puede estar influenciando en la capacidad de interacción con el DTX, ya que se ha descrito que, dependiendo del estímulo en los macrófagos, estos pueden cambiar su composición de lípidos neutros, fosfolípidos y esfingolípidos[162]. No obstante, se requieren más experimentos para corroborar este fenómeno.

Aunque de manera preliminar, el análisis de los mecanismos de internalización de las vesículas reveló que la dependencia de la endocitosis mediada por clatrina para la internalización de EXTs y DTX-EXTs destaca un mecanismo predominante para la internalización de vesículas. Interesante fue que, en presencia de amilorida y omeprazol, que inhiben la macropinocitosis y la fusión de membranas, respectivamente, la internalización de EXTs-M1 y DTX-EXTs-M1 aumentó (Figura 31). Este comportamiento opuesto sugiere que, en lugar de bloquear la entrada de las vesículas, estos inhibidores podrían estar alterando la

dinámica de la membrana de tal forma que faciliten la captación de las vesículas en ciertas condiciones. Por ejemplo, amilorida bloquea las vías conductoras de sodio de la membrana celular, lo que altera el potencial electroquímico de la membrana y con ello su carga[163].

Al igual que en los DTX-EXTs-NK, los DTX-EXTs-M1 mostraron el mayor impacto en la actividad mitocondrial en ambas concentraciones analizadas y en ambas líneas celulares, reduciendo la viabilidad celular en aproximadamente un 50%. En comparación, los EXTs y EVs tuvieron un efecto significativamente menor, con una disminución del 25-30% en la actividad mitocondrial (Figura 32). Este resultado es consistente con estudios previos que indican que los exosomas derivados de macrófagos M1 pueden reducir la viabilidad celular en un 20%[164].

Al analizar las concentraciones, se observó que 5 µg de proteínas de DTX-EXTs-M1 contenían 3.84 ± 2.21 nM de docetaxel encapsulado, lo que sugiere que se requiere entre 5.4 y 5.5 veces menos docetaxel para lograr un efecto citotóxico similar al del fármaco libre en las células H1975 y H1299, respectivamente. Esto se basa en una eficiencia de encapsulación (%IEE) del 71.57% (Figura 30). Sin embargo, el efecto fue menor al esperado, ya que las vesículas derivadas de células M1 tienen un 70% más de encapsulación en comparación con las originadas por células NK, lo que sugiere que deberían haber mostrado una

eficacia similar o mayor. Este resultado indica que, aunque diferentes células inmunes pueden ser utilizadas para formular vesículas sintéticas como sistemas de liberación de fármacos, las propiedades intrínsecas de las células donadoras juegan un papel clave en la eficacia final del tratamiento (Figura 32).

A pesar de esto, es importante destacar que reducir 5.5 veces la dosis de docetaxel necesaria para lograr un efecto similar al del fármaco libre podría tener un impacto significativo en la disminución de los efectos adversos asociados con dosis terapéuticas altas, mejorando así el estado de salud del paciente[165,166].

Por otro lado, el comportamiento diferencial observado entre las líneas H1975 y H1299 en cultivos 3D resalta la heterogeneidad celular presente en el cáncer. Mientras que H1975 mostró un crecimiento sostenido desde el inicio (Figura 35), H1299 experimentó un crecimiento retardado pero acelerado a las 96 horas, lo que sugiere una adaptación más lenta seguida de una proliferación significativa en el entorno tridimensional (Figura 36). Estas diferencias reflejan las particularidades de los tumores derivados de distintos tipos de carcinoma pulmonar, subrayando la importancia de los modelos esféricos para evaluar la eficacia de nuevas formulaciones farmacológicas[167].

Finalmente, aunque el objetivo principal de este estudio fue comprender cómo la composición, morfología, estabilidad coloidal y la cantidad de docetaxel en las vesículas influyen en su interacción con las células cancerígenas y, en consecuencia, en su viabilidad, y que también se observó que estas interacciones varían según el tipo de célula de origen de la extrusión. Es importante destacar que las características intrínsecas de cada línea celular también juegan un papel fundamental en cómo interactúan con las vesículas, más aún si consideramos que el crecimiento tumoral es en conglomerados e independiente de anclaje. Por lo tanto, la respuesta final es el resultado de una combinación entre las propiedades de las vesículas y las características de las células receptoras, por lo que se hace crucial que, para el desarrollo de futuros tratamientos similares, se considere el análisis de la célula cancerígena considerando su capacidad para recibir vesículas.

CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio proporciona una caracterización integral de los EVs, EXTs y DTX-EXTs derivados de células NK, demostrando sus propiedades distintas y diferencias funcionales. Identificamos la endocitosis dependiente de clatrina como el principal mecanismo de captación para las células A549 y H1975 y encontramos efectos diferenciales entre los EVs, EXTs y DTX-EXTs.

La encapsulación de DTX en EXTs durante el proceso de extrusión da lugar a vesículas que contienen las principales proteínas citotóxicas de las células NK, así como un rango bajo de DTX en el orden de concentraciones picomolares por μg de vesículas, mostrando un potencial citotóxico significativamente mayor. Por lo tanto, los DTX-EXTs podrían aumentar la eficacia del DTX al evitar los mecanismos de resistencia celular al DTX y actuar directamente sobre el lisosoma.

Por otro lado, el uso alternativo de otra fuente celular del sistema inmune, como los macrófagos M1 para la generación de extrusomas debido a su rol clave en la respuesta antitumoral, promoviendo apoptosis y limitando la angiogénesis, mostraron una alta eficiencia de encapsulación de docetaxel en EXTs-M1 y una reducción de cinco veces en la dosis necesaria de docetaxel para obtener efectos citotóxicos. Adicionalmente, y al igual que en las vesículas generadas a partir de células NK, de manera preliminar se identificó que la endocitosis mediada por clatrina sería el principal mecanismo de internalización para las células H1975 y H1299.

Finalmente, estos resultados sugieren que las propiedades de las células donadoras juegan un papel crucial en la eficacia citotóxica frente a células de CP.

En estudios futuros, es necesario evaluar la eficacia en cultivos 3D para luego pasar a modelos *in vivo* y los posibles efectos secundarios para comprender

completamente el potencial de una nueva terapia y cómo estas propiedades cambiarían con el uso de otros fármacos en el encapsulamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024;74:229–63.
- [2] WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Development. 2020.
- [3] Cancer Today n.d. <https://gco.iarc.who.int/today/> (accessed September 25, 2024).
- [4] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
- [5] División de Prevención y Control de Enfermedades. DIPRECE n.d. <https://diprece.minsal.cl/> (accessed September 25, 2024).
- [6] Rojas Hitschfeld HA. Análisis epidemiológico: Mortalidad por cáncer de pulmón e indicadores de consumo de cigarrillo en Chile 2010-2018. *Rev Inst Salud Pública Chile* 2021;5:21–7.
- [7] Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med* 2020;41:1–24.
- [8] Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997;315:980–8.

- [9] Sandoval RC, Bacelar Gomes A, Roche M, Parra N, Armada F. [Advances in tobacco control in the Region of the Americas, 2020Avanços no controle do tabagismo na Região das Américas 2020]. Rev Panam Salud Publica 2021;45:e94.
- [10] Comprehensive Cancer Information 1980. <https://www.cancer.gov/> (accessed September 25, 2024).
- [11] Gilbertson RJ. Mapping cancer origins. Cell 2011;145:25–9.
- [12] Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. Cancer Treat Res 2016;170:25–46.
- [13] Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. Chest 2017;151:193–203.
- [14] Conic I, Dimov I, Tasic-Dimov D, Djordjevic B, Stefanovic V. Ovarian epithelial cancer stem cells. ScientificWorldJournal 2011;11:1243–69.
- [15] Pavlopoulou A, Oktay Y, Vougas K, Louka M, Vorgias CE, Georgakilas AG. Determinants of resistance to chemotherapy and ionizing radiation in breast cancer stem cells. Cancer Lett 2016;380:485–93.
- [16] Burgos-Ojeda D, Rueda BR, Buckanovich RJ. Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. Cancer Lett 2012;322:1–7.
- [17] MacDonagh L, Gray SG, Breen E, Cuffe S, Finn SP, O'Byrne KJ, et al. Lung cancer stem cells: The root of resistance. Cancer Lett 2016;372:147–56.
- [18] Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell

lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2019;19:495–509.

- [19] Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, et al. KRAS mutations in lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2013;14:205–14.
- [20] da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR mutations and lung cancer. *Annu Rev Pathol* 2011;6:49–69.
- [21] Tissot C, Couraud S, Tanguy R, Bringuier P-P, Girard N, Souquet P-J. Clinical characteristics and outcome of patients with lung cancer harboring BRAF mutations. *Lung Cancer* 2016;91:23–8.
- [22] Shaw AT, Engelman JA. ALK in lung cancer: past, present, and future. *J Clin Oncol* 2013;31:1105–11.
- [23] Joshi A, Pande N, Noronha V, Patil V, Kumar R, Chougule A, et al. ROS1 mutation non-small cell lung cancer-access to optimal treatment and outcomes. *Ecancermedicalscience* 2019;13:900.
- [24] Jiang W, Cai G, Hu PC, Wang Y. Personalized medicine in non-small cell lung cancer: a review from a pharmacogenomics perspective. *Acta Pharm Sin B* 2018;8:530–8.
- [25] Zhang J, IJzerman MJ, Oberoi J, Karnchanachari N, Bergin RJ, Franchini F, et al. Time to diagnosis and treatment of lung cancer: A systematic overview of risk factors, interventions and impact on patient outcomes. *Lung Cancer* 2022;166:27–39.

- [26] Guidelines Detail. NCCN n.d. <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail> (accessed September 25, 2024).
- [27] [No title] n.d. https://diprece.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/05/RE_GPC-C%C3%A1ncer-de-Pulm%C3%B3n_2018.pdf (accessed September 25, 2024).
- [28] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364–78.
- [29] Li Y, Yan B, He S. Advances and challenges in the treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2023;169:115891.
- [30] Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:288–91.
- [31] Bumbaca B, Li W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B* 2018;8:518–29.
- [32] Tan Q, Liu X, Fu X, Li Q, Dou J, Zhai G. Current development in nanoformulations of docetaxel. *Expert Opin Drug Deliv* 2012;9:975–90.
- [33] Engels FK, Mathot RAA, Verweij J. Alternative drug formulations of docetaxel: a review. *Anticancer Drugs* 2007;18:95–103.
- [34] Sparreboom A, Zhao M, Brahmer JR, Verweij J, Baker SD. Determination of the docetaxel vehicle, polysorbate 80, in patient samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;773:183–90.

- [35] Scagliotti GV, Turrisi AT 3rd. Docetaxel-based combined-modality chemoradiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2003;8:361–74.
- [36] Herbst RS, Khuri FR. Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 2003;29:407–15.
- [37] Sekino Y, Teishima J. Molecular mechanisms of docetaxel resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resist* 2020;3:676–85.
- [38] Galletti E, Magnani M, Renzulli ML, Botta M. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes. *ChemMedChem* 2007;2:920–42.
- [39] Baker J, Ajani J, Scotté F, Winther D, Martin M, Aapro MS, et al. Docetaxel-related side effects and their management. *Eur J Oncol Nurs* 2009;13:49–59.
- [40] Weiss GJ, Rosell R, Fossella F, Perry M, Stahel R, Barata F, et al. The impact of induction chemotherapy on the outcome of second-line therapy with pemetrexed or docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2007;18:453–60.
- [41] Lohiya V, Aragon-Ching JB, Sonpavde G. Role of Chemotherapy and Mechanisms of Resistance to Chemotherapy in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Med Insights Oncol* 2016;10:57–66.
- [42] Marín-Aguilera M, Jiménez N, Reig Ò, Montalbo R, Verma AK, Castellano G, et al. Androgen Receptor and Its Splicing Variant 7 Expression in Peripheral

Blood Mononuclear Cells and in Circulating Tumor Cells in Metastatic
Castration-Resistant Prostate Cancer. Cells 2020;9.
<https://doi.org/10.3390/cells9010203>.

- [43] Seruga B, Ocana A, Tannock IF. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:12–23.
- [44] Ranasinghe R, Mathai ML, Zulli A. Cisplatin for cancer therapy and overcoming chemoresistance. *Heliyon* 2022;8:e10608.
- [45] Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 2006;70:1390–4.
- [46] Dai C-H, Li J, Chen P, Jiang H-G, Wu M, Chen Y-C. RNA interferences targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway upstream genes reverse cisplatin resistance in drug-resistant lung cancer cells. *J Biomed Sci* 2015;22:77.
- [47] Browning RJ, Reardon PJT, Parhizkar M, Pedley RB, Edirisinghe M, Knowles JC, et al. Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* 2017;11:8560–78.
- [48] Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2019;10:2965.
- [49] Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*

2014;5:12472–508.

- [50] Ebrahimi N, Akbari M, Ghanaatian M, Roozbahani Moghaddam P, Adelian S, Borjian Boroujeni M, et al. Development of neoantigens: from identification in cancer cells to application in cancer vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2022;21:941–55.
- [51] Onoi K, Chihara Y, Uchino J, Shimamoto T, Morimoto Y, Iwasaku M, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review. *J Clin Med Res* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/jcm9051362>.
- [52] Fang L, Ly D, Wang S-S, Lee JB, Kang H, Xu H, et al. Targeting late-stage non-small cell lung cancer with a combination of DNT cellular therapy and PD-1 checkpoint blockade. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38:123.
- [53] Rethacker L, Dulphy N, Caignard A. Challenges for NK cell-based therapies: What can we learn from lymph nodes? *Successes and Challenges of NK Immunotherapy*, Elsevier; 2021, p. 33–51.
- [54] Wang S, Wang J, Chen Z, Luo J, Guo W, Sun L, et al. Targeting M2-like tumor-associated macrophages is a potential therapeutic approach to overcome antitumor drug resistance. *NPJ Precis Oncol* 2024;8:31.
- [55] Liu Y, Wang R. Immunotherapy Targeting Tumor-Associated Macrophages. *Front Med* 2020;7:583708.
- [56] Kichloo A, Albosta M, Dahiya D, Guidi JC, Aljadah M, Singh J, et al. Systemic adverse effects and toxicities associated with immunotherapy: A review.

World J Clin Oncol 2021;12:150–63.

- [57] Meza Guzman LG, Keating N, Nicholson SE. Natural Killer Cells: Tumor Surveillance and Signaling. *Cancers* 2020;12.
<https://doi.org/10.3390/cancers12040952>.
- [58] Tomasello E, Yessaad N, Gregoire E, Hudspeth K, Luci C, Mavilio D, et al. Mapping of NKp46(+) Cells in Healthy Human Lymphoid and Non-Lymphoid Tissues. *Front Immunol* 2012;3:344.
- [59] Trapani JA. Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Aust N Z J Med* 1995;25:793–9.
- [60] Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 1995;181:1235–8.
- [61] Deniz G, van de Veen W, Akdis M. Natural killer cells in patients with allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:527–35.
- [62] Alspach E, Lussier DM, Schreiber RD. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2019;11.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>.
- [63] Bendickova K, Fric J. Roles of IL-2 in bridging adaptive and innate immunity, and as a tool for cellular immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2020;108:427–37.
- [64] Yoon SR, Kim T-D, Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural

killer cell therapy. *Exp Mol Med* 2015;47:e141.

- [65] Schneider T, Kimpfler S, Warth A, Schnabel PA, Dienemann H, Schadendorf D, et al. Foxp3(+) regulatory T cells and natural killer cells distinctly infiltrate primary tumors and draining lymph nodes in pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:432–8.
- [66] Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4120–5.
- [67] Hodge G, Barnawi J, Jurisevic C, Moffat D, Holmes M, Reynolds PN, et al. Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)- γ by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells. *Clin Exp Immunol* 2014;178:79–85.
- [68] Rea D, Henry G, Khaznadar Z, Etienne G, Guilhot F, Nicolini F, et al. Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica* 2017;102:1368–77.
- [69] Zeng Y, Lv X, Du J. Natural killer cell-based immunotherapy for lung cancer: Challenges and perspectives (Review). *Oncol Rep* 2021;46. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8183>.
- [70] Barnes SA, Trew I, de Jong E, Foley B. Making a Killer: Selecting the Optimal

Natural Killer Cells for Improved Immunotherapies. *Front Immunol* 2021;12:765705.

[71] Berrien-Elliott MM, Jacobs MT, Fehniger TA. Allogeneic natural killer cell therapy. *Blood* 2023;141:856–68.

[72] Page A, Chuvin N, Valladeau-Guilemond J, Depil S. Development of NK cell-based cancer immunotherapies through receptor engineering. *Cell Mol Immunol* 2024;21:315–31.

[73] Kang Y-T, Niu Z, Hadlock T, Purcell E, Lo T-W, Zeinali M, et al. On-Chip Biogenesis of Circulating NK Cell-Derived Exosomes in Non-Small Cell Lung Cancer Exhibits Antitumoral Activity. *Adv Sci* 2021;8:2003747.

[74] Burtenshaw D, Regan B, Owen K, Collins D, McEneaney D, Megson IL, et al. Exosomal Composition, Biogenesis and Profiling Using Point-of-Care Diagnostics-Implications for Cardiovascular Disease. *Front Cell Dev Biol* 2022;10:853451.

[75] Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzás EI, Di Vizio D, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell Vesicles* 2017;6:1396823.

[76] Krylova SV, Feng D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *Int J Mol Sci* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>.

[77] Prada I, Meldolesi J. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *Int J Mol Sci* 2016;17.

<https://doi.org/10.3390/ijms17081296>.

- [78] Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>.
- [79] McKelvey KJ, Powell KL, Ashton AW, Morris JM, McCracken SA. Exosomes: Mechanisms of Uptake. *J Circ Biomark* 2015;4:7.
- [80] Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* 2018;18:47.
- [81] Bonsergent E, Grisard E, Buchrieser J, Schwartz O, Théry C, Lavieu G. Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nat Commun* 2021;12:1864.
- [82] Kwok ZH, Wang C, Jin Y. Extracellular Vesicle Transportation and Uptake by Recipient Cells: A Critical Process to Regulate Human Diseases. *Processes (Basel)* 2021;9. <https://doi.org/10.3390/pr9020273>.
- [83] Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ, Chivet M, Lachenal G, Blot B, et al. Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell Mol Life Sci* 2018;75:757–73.
- [84] Jurgielewicz BJ, Yao Y, Stice SL. Kinetics and Specificity of HEK293T Extracellular Vesicle Uptake using Imaging Flow Cytometry. *Nanoscale Res Lett* 2020;15:170.

- [85] Williams C, Pazos R, Royo F, González E, Roura-Ferrer M, Martinez A, et al. Assessing the role of surface glycans of extracellular vesicles on cellular uptake. *Sci Rep* 2019;9:11920.
- [86] Jia Y, Yu L, Ma T, Xu W, Qian H, Sun Y, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics* 2022;12:6548–75.
- [87] Liu Y, Xia Y, Smollar J, Mao W, Wan Y. The roles of small extracellular vesicles in lung cancer: Molecular pathology, mechanisms, diagnostics, and therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021;1876:188539.
- [88] Busatto S, Morad G, Guo P, Moses MA. The role of extracellular vesicles in the physiological and pathological regulation of the blood-brain barrier. *FASEB Bioadv* 2021;3:665–75.
- [89] Shahi S, Kang T, Fonseka P. Extracellular Vesicles in Pathophysiology: A Prudent Target That Requires Careful Consideration. *Cells* 2024;13. <https://doi.org/10.3390/cells13090754>.
- [90] Chang W-H, Cerione RA, Antonyak MA. Extracellular Vesicles and Their Roles in Cancer Progression. *Methods Mol Biol* 2021;2174:143–70.
- [91] Asare-Werehene M, Nakka K, Reunov A, Chiu C-T, Lee W-T, Abedini MR, et al. The exosome-mediated autocrine and paracrine actions of plasma gelsolin in ovarian cancer chemoresistance. *Oncogene* 2020;39:1600–16.
- [92] Maacha S, Bhat AA, Jimenez L, Raza A, Haris M, Uddin S, et al. Extracellular

- vesicles-mediated intercellular communication: roles in the tumor microenvironment and anti-cancer drug resistance. *Mol Cancer* 2019;18:55.
- [93] Spugnini EP, Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, Fais S. A Role of Tumor-Released Exosomes in Paracrine Dissemination and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19123968>.
- [94] Strnadová K, Pfeiferová L, Přikryl P, Dvořánková B, Vlčák E, Frýdlová J, et al. Exosomes produced by melanoma cells significantly influence the biological properties of normal and cancer-associated fibroblasts. *Histochem Cell Biol* 2022;157:153–72.
- [95] Chen QY, Gao B, Tong D, Huang C. Crosstalk between extracellular vesicles and tumor-associated macrophage in the tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2023;552:215979.
- [96] Liao H, Zhang C, Wang F, Jin F, Zhao Q, Wang X, et al. Tumor-derived extracellular vesicle proteins as new biomarkers and targets in precision oncology. *J Mol Med* 2024;102:961–71.
- [97] Mathew M, Zade M, Mezghani N, Patel R, Wang Y, Momen-Heravi F. Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cancer Immunotherapy. *Cancers* 2020;12. <https://doi.org/10.3390/cancers12102825>.
- [98] An T, Qin S, Sun D, Huang Y, Hu Y, Li S, et al. Unique Protein Profiles of Extracellular Vesicles as Diagnostic Biomarkers for Early and Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Proteomics* 2019;19:e1800160.

- [99] Yang P, Peng Y, Feng Y, Xu Z, Feng P, Cao J, et al. Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles - New Strategies in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2021;12:771551.
- [100] Chen Q, Li Y, Gao W, Chen L, Xu W, Zhu X. Exosome-Mediated Crosstalk Between Tumor and Tumor-Associated Macrophages. *Front Mol Biosci* 2021;8:764222.
- [101] Tian J-W, Zhang H-J, Li S-Y, Guo Y-L, Chen G, Yu Z-L. Tumor Cell-derived Extracellular Vesicles in Modulating Phenotypes and Immune Functions of Macrophages: Mechanisms and Therapeutic Applications. *J Cancer* 2023;14:1321–34.
- [102] Zhang W, Zhou R, Liu X, You L, Chen C, Ye X, et al. Key role of exosomes derived from M2 macrophages in maintaining cancer cell stemness (Review). *Int J Oncol* 2023;63. <https://doi.org/10.3892/ijo.2023.5574>.
- [103] St-Denis-Bissonnette F, Cummings SE, Qiu S, Stalker A, Muradia G, Mehic J, et al. A clinically relevant large-scale biomanufacturing workflow to produce natural killer cells and natural killer cell-derived extracellular vesicles for cancer immunotherapy. *J Extracell Vesicles* 2023;12:e12387.
- [104] Enomoto Y, Li P, Jenkins LM, Anastasakis D, Lyons GC, Hafner M, et al. Cytokine-enhanced cytolytic activity of exosomes from NK Cells. *Cancer Gene Ther* 2022;29:734–49.
- [105] Zhao J, Schlößer HA, Wang Z, Qin J, Li J, Popp F, et al. Tumor-Derived

Extracellular Vesicles Inhibit Natural Killer Cell Function in Pancreatic Cancer.

Cancers 2019;11. <https://doi.org/10.3390/cancers11060874>.

[106] Chen Y-S, Lin E-Y, Chiou T-W, Harn H-J. Exosomes in clinical trial and their production in compliance with good manufacturing practice. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi* 2020;32:113–20.

[107] Lu S, Cui Q, Zheng H, Ma Y, Kang Y, Tang K. Challenges and Opportunities for Extracellular Vesicles in Clinical Oncology Therapy. *Bioengineering* (Basel) 2023;10. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10030325>.

[108] Jang SC, Kim OY, Yoon CM, Choi D-S, Roh T-Y, Park J, et al. Bioinspired exosome-mimetic nanovesicles for targeted delivery of chemotherapeutics to malignant tumors. *ACS Nano* 2013;7:7698–710.

[109] Nasiri Kenari A, Cheng L, Hill AF. Methods for loading therapeutics into extracellular vesicles and generating extracellular vesicles mimetic-nanovesicles. *Methods* 2020;177:103–13.

[110] Pisano S, Pierini I, Gu J, Gazze A, Francis LW, Gonzalez D, et al. Immune (Cell) Derived Exosome Mimetics (IDEM) as a Treatment for Ovarian Cancer. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:553576.

[111] Jang SC, Gho YS. Could bioengineered exosome-mimetic nanovesicles be an efficient strategy for the delivery of chemotherapeutics? *Nanomedicine* 2014;9:177–80.

- [112] Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024;13:e12404.
- [113] Choo YW, Kang M, Kim HY, Han J, Kang S, Lee J-R, et al. M1 Macrophage-Derived Nanovesicles Potentiate the Anticancer Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *ACS Nano* 2018;12:8977–93.
- [114] Zhu L, Gangadaran P, Kalimuthu S, Oh JM, Baek SH, Jeong SY, et al. Novel alternatives to extracellular vesicle-based immunotherapy - exosome mimetics derived from natural killer cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:S166–79.
- [115] Zhu L, Kalimuthu S, Gangadaran P, Oh JM, Lee HW, Baek SH, et al. Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* 2017;7:2732–45.
- [116] Leiva-Sabadini C, Alvarez S, Barrera NP, Schuh CMAP, Aguayo S. Antibacterial Effect of Honey-Derived Exosomes Containing Antimicrobial Peptides Against Oral Streptococci. *Int J Nanomedicine* 2021;16:4891–900.
- [117] Dobosz P, Stępień M, Golke A, Dzieciatkowski T. Challenges of the Immunotherapy: Perspectives and Limitations of the Immune Checkpoint Inhibitor Treatment. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23052847>.
- [118] Zhang X, Liu L, Tang M, Li H, Guo X, Yang X. The effects of umbilical cord-

- derived macrophage exosomes loaded with cisplatin on the growth and drug resistance of ovarian cancer cells. *Drug Dev Ind Pharm* 2020;46:1150–62.
- [119] Ramírez O, Pomareda F, Olivares B, Huang Y-L, Zavala G, Carrasco-Rojas J, et al. Aloe vera peel-derived nanovesicles display anti-inflammatory properties and prevent myofibroblast differentiation. *Phytomedicine* 2024;122:155108.
- [120] Lawrenson K, Grun B, Gayther SA. Heterotypic three-dimensional in vitro modeling of stromal-epithelial interactions during ovarian cancer initiation and progression. *J Vis Exp* 2012:e4206.
- [121] Tong L, Jiménez-Cortegana C, Tay AHM, Wickström S, Galluzzi L, Lundqvist A. NK cells and solid tumors: therapeutic potential and persisting obstacles. *Mol Cancer* 2022;21:206.
- [122] Zhang P, Zhang G, Wan X. Challenges and new technologies in adoptive cell therapy. *J Hematol Oncol* 2023;16:97.
- [123] Kumar MA, Baba SK, Sadida HQ, Marzooqi SA, Jerobin J, Altemani FH, et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:27.
- [124] Nguyen VD, Kim HY, Choi YH, Park J-O, Choi E. Tumor-derived extracellular vesicles for the active targeting and effective treatment of colorectal tumors. *Drug Deliv* 2022;29:2621–31.
- [125] Wan J, Ma X, Xu D, Yang B, Yang S, Han S. Docetaxel-decorated

- anticancer drug and gold nanoparticles encapsulated apatite carrier for the treatment of liver cancer. *J Photochem Photobiol B* 2018;185:73–9.
- [126] Saloustros E, Georgoulas V. Docetaxel in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1207–22.
- [127] Authelin J-R, Andert D, Boilait L, Nguyen-Huu J-J, Zhang Y-Y, Ni P. Docetaxel Formulation in Polysorbate 80: A Complex and Sensitive System. *Am J Pharmacol Ther* 2020;4:001–6.
- [128] Schwartzberg LS, Navari RM. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Adv Ther* 2018;35:754–67.
- [129] Aranda E, Teruel JA, Ortiz A, Pérez-Cárceles MD, Aranda FJ. Interaction of Docetaxel with Phosphatidylcholine Membranes: A Combined Experimental and Computational Study. *J Membr Biol* 2022;255:277–91.
- [130] Sharma D, Singh J. Synthesis and Characterization of Fatty Acid Grafted Chitosan Polymer and Their Nanomicelles for Nonviral Gene Delivery Applications. *Bioconjug Chem* 2017;28:2772–83.
- [131] Surianarayanan R, Gurumallappa Shivakumar H, Varma Vegesna NSK, Srivastava A. Effect of sample Concentration on the Characterization of Liposomes using Dynamic light Scattering Technique. *Pharm Methods* 2016;7:70–4.
- [132] Zhao Y, Zheng Y, Zhu Y, Li H, Zhu H, Liu T. Docetaxel-loaded M1 macrophage-derived exosomes for a safe and efficient

- chemoimmunotherapy of breast cancer. *J Nanobiotechnology* 2022;20:359.
- [133] Staebler S, Hoechst S, Thongmao A, Schneider N, Bosserhoff A-K, Kuphal S. The Role of T-Cadherin (CDH13) in Treatment Options with Garcinol in Melanoma. *Cancers* 2024;16. <https://doi.org/10.3390/cancers16101853>.
- [134] Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Transforming growth Factor-Beta-Induced Protein (TGFB1)/(β ig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13:10461–77.
- [135] Tian M, Wang X, Sun J, Lin W, Chen L, Liu S, et al. IRF3 prevents colorectal tumorigenesis via inhibiting the nuclear translocation of β -catenin. *Nat Commun* 2020;11:5762.
- [136] Redondo-García S, Barritt C, Papagregoriou C, Yeboah M, Frendeus B, Cragg MS, et al. Human leukocyte immunoglobulin-like receptors in health and disease. *Front Immunol* 2023;14:1282874.
- [137] Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 2016;16:7–19.
- [138] Farcas M, Inngjerdigen M. Natural killer cell-derived extracellular vesicles in cancer therapy. *Scand J Immunol* 2020;92:e12938.
- [139] Federici C, Shahaj E, Cecchetti S, Camerini S, Casella M, Iessi E, et al. Natural-Killer-Derived Extracellular Vesicles: Immune Sensors and Interactors. *Front Immunol* 2020;11:262.
- [140] Wu J-Y, Ji A-L, Wang Z-X, Qiang G-H, Qu Z, Wu J-H, et al. Exosome-

Mimetic Nanovesicles from Hepatocytes promote hepatocyte proliferation in vitro and liver regeneration in vivo. *Sci Rep* 2018;8:2471.

- [141] Kalimuthu S, Gangadaran P, Rajendran RL, Zhu L, Oh JM, Lee HW, et al. A New Approach for Loading Anticancer Drugs Into Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Mimetics for Cancer Therapy. *Front Pharmacol* 2018;9:1116.
- [142] Yang C-H, Chou H-C, Fu Y-N, Yeh C-L, Cheng H-W, Chang I-C, et al. EGFR over-expression in non-small cell lung cancers harboring EGFR mutations is associated with marked down-regulation of CD82. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1540–9.
- [143] Guéguinou M, Gambade A, Félix R, Chantôme A, Fourbon Y, Bougnoux P, et al. Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim Biophys Acta* 2015;1848:2603–20.
- [144] Zhang Z, Wang L, Du J, Li Y, Yang H, Li C, et al. Lipid raft localization of epidermal growth factor receptor alters matrix metalloproteinase-1 expression in SiHa cells via the MAPK/ERK signaling pathway. *Oncol Lett* 2016;12:4991–8.
- [145] Puri C, Tosoni D, Comai R, Rabellino A, Segat D, Caneva F, et al. Relationships between EGFR signaling-competent and endocytosis-competent membrane microdomains. *Mol Biol Cell* 2005;16:2704–18.

- [146] Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 2008;15:209–19.
- [147] Zhao X, Liu X, Su L. Parthenolide induces apoptosis via TNFRSF10B and PMAIP1 pathways in human lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2014;33:3.
- [148] Mediavilla-Varela M, Pacheco FJ, Almaguel F, Perez J, Sahakian E, Daniels TR, et al. Docetaxel-induced prostate cancer cell death involves concomitant activation of caspase and lysosomal pathways and is attenuated by LEDGF/p75. *Mol Cancer* 2009;8:68.
- [149] Mirali S, Schimmer AD. The role of mitochondrial proteases in leukemic cells and leukemic stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2020;9:1481–7.
- [150] Romani AMP. Cisplatin in cancer treatment. *Biochem Pharmacol* 2022;206:115323.
- [151] Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:847–57.
- [152] Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:3–18.

- [153] Wang M-C, Liang X, Liu Z-Y, Cui J, Liu Y, Jing L, et al. In vitro synergistic antitumor efficacy of sequentially combined chemotherapy/icotinib in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2015;33:239–49.
- [154] Geoghegan F, Buckland RJ, Rogers ET, Khalifa K, O'Connor EB, Rooney MF, et al. Bioenergetics of acquired cisplatin resistant H1299 non-small cell lung cancer and P31 mesothelioma cells. *Oncotarget* 2017;8:94711–25.
- [155] Walter AO, Sjin RTT, Haringsma HJ, Ohashi K, Sun J, Lee K, et al. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer Discov* 2013;3:1404–15.
- [156] Arenas M, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Fernández-Sanfrancisco O, Alonso E. Comparison of Different Techniques for the Determination of Platinized Cytostatic Drugs in Urine Samples. *Molecules* 2022;27. <https://doi.org/10.3390/molecules27238139>.
- [157] Peña-Romero AC, Orenes-Piñero E. Dual Effect of Immune Cells within Tumour Microenvironment: Pro- and Anti-Tumour Effects and Their Triggers. *Cancers* 2022;14. <https://doi.org/10.3390/cancers14071681>.
- [158] Al-Qubati AA, Rahmadi M, Widiandani T, Al-Maamari JN, Khotib J. The role of IL-1, IL-6 and TNF- α in breast cancer development and progression. *Pharm Educ* 2024;24:32–8.
- [159] Weigert A, Brüne B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. *Nitric Oxide* 2008;19:95–102.

- [160] Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front Immunol* 2020;11:1276.
- [161] Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia* 2007;21:2085–9.
- [162] Tacconi S, Vari F, Sbarigia C, Vardanyan D, Longo S, Mura F, et al. M1-derived extracellular vesicles polarize recipient macrophages into M2-like macrophages and alter skeletal muscle homeostasis in a hyper-glucose environment. *Cell Commun Signal* 2024;22:193.
- [163] O’Neil RG, Boulpaep EL. Effect of amiloride on the apical cell membrane cation channels of a sodium-absorbing, potassium-secreting renal epithelium. *J Membr Biol* 1979;50:365–87.
- [164] Tang Z, Tang C, Sun C, Ying X, Shen R. M1 macrophage-derived exosomes synergistically enhance the anti- bladder cancer effect of gemcitabine. *Aging* 2022;14:7364–77.
- [165] Al-Batran S-E, Hozaeel W, Tauchert FK, Hofheinz R-D, Hinke A, Windemuth-Kieselbach C, et al. The impact of docetaxel-related toxicities on health-related quality of life in patients with metastatic cancer (QoliTax). *Ann Oncol* 2015;26:1244–8.
- [166] Nuzzo F, Morabito A, Gravina A, Di Rella F, Landi G, Pacilio C, et al. Effects on quality of life of weekly docetaxel-based chemotherapy in patients with locally advanced or metastatic breast cancer: results of a single-centre

randomized phase 3 trial. BMC Cancer 2011;11:75.

- [167] Yun C, Kim SH, Kim KM, Yang MH, Byun MR, Kim J-H, et al. Advantages of Using 3D Spheroid Culture Systems in Toxicological and Pharmacological Assessment for Osteogenesis Research. Int J Mol Sci 2024;25. <https://doi.org/10.3390/ijms25052512>.

ANEXOS

Tabla 4. Subcategorías de los parámetros T, N y M. Fuente: Tabla 3 de Detterbeck y cols[13] (modificado).

T (tumor primario)		Nivel
T0	Sin tumor primario	
Tis	Carcinoma in situ (escamoso o adenocarcinoma)	Tis
T1	Tumor ≤ 3 cm	
T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo	T1a _(mi)
T1a	Tumor superficial diseminado en vías respiratorias centrales	T1a _{ss}
T1a	Tumor ≤ 1 cm	T1a _{≤ 1}
T1b	Tumor > 1 cm pero ≤ 2 cm	T1b _{$> 1-2$}
T1c	Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm	T1c _{$> 2-3$}
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm o tumor que involucra:	
	Pleura visceral	T2 _{visc Pl}
	bronquios principales (sin carina) atelectasia a hilio	T2 _{Centr}
T2a	Tumor > 3 cm pero ≤ 4 cm	T2a _{$> 3-4$}
T2b	Tumor > 4 cm pero ≤ 5 cm	T2b _{$> 4-5$}
T3	Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm	T3 _{$> 5-7$}
	O invade la pared torácica, pericardio, nervio frénico	T3 _{Inv}
	O nódulo(s) tumoral separado en el mismo lóbulo	T3 _{Satell}
T4	Tumor > 7 cm	T4 _{> 7}
	O invade: mediastino, diafragma, corazón, vasos grandes, carina,	T4 _{Inv}

	nervio laríngeo recurrente, tráquea, esófago, columna vertebral	
	O tumor en nódulo(s) de diferentes lóbulos ipsilaterales	T4 <i>Ipsi Nod</i>
N (nodos linfáticos regionales)		
N0	Sin metástasis en los nódulos regionales	
N1	metástasis en el pulmón ipsilateral o nódulos hiliares	
N2	metástasis en el mediastino ipsilateral/nódulos subcarinales	
N3	metástasis contralateral mediastinal/hiliar o nódulos supraclaviculares	
M (metástasis distante)		
M0	Sin metástasis distante	
	Crecimiento maligno en pleura/efusión pericardial	M1a <i>Pl</i>
M1a		<i>Dissem</i>
	O en nódulos en pleura/pericardio	M1a <i>Contr</i>
		<i>Nod</i>
M1b	metástasis extratorácica única	M1b <i>Single</i>
M1c	múltiples metástasis extratorácicas (1 o > 1 órgano)	M1c <i>Multi</i>

Tabla 5. Clasificación de subgrupos de estadios del cáncer de pulmón.

Fuente: Tabla 5 de Detterbeck y cols[13] (modificado).

T/M	NIVEL	N0	N1	N2	N3
T1	T1a _{≤1}	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b _{> 1-2}	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c _{> 2-3}	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2 Central Visc PI	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a _{> 3-4}	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b _{> 4-5}	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 _{> 5-7}	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 _{> 7}	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>PI</i> <i>Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>Contr</i> <i>Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabla 6. Especificaciones de los anticuerpos y detalles de las condiciones para el análisis por Western Blot.

Anticuerpo	Peso molecular (KDa)	Dilución	Especie husesped	Duente	cat#	Marca
anti-TSG101	45	1:500	goat	polyclonal	sc6037	Santa Cruz Biotechnology
anti-Syntenin	32	1:1000	rabbit	monoclonal	ab19903	Abcam
anti-CD63	30-60	1:1000	mouse	monoclonal	ab59479	Abcam
anti-CD9	22,24,35	1:500	rabbit	monoclonal	13174	Cell Signaling Technology
anti-HSP70	60 y 70	1:1000	rat	monoclonal	4873	Cell Signaling Technology
anti-HSP90	90	1:1000	rabbit	polyclonal	4875	Cell Signaling Technology

anti-Flotilin-I	70	1:1000	rabbit	monoclonal	18634	Cell Signaling Technology
anti-Calnexin	90	1:1000	rabbit	polyclonal	2433	Cell Signaling Technology
anti-Perforin	70-75	1:1000	rabbit	monoclonal	62550	Cell Signaling Technology
anti-FasL	40	1:1000	rabbit	monoclonal	68405	Cell Signaling Technology
anti-GAPDH	37	1:1000	rabbit	monoclonal	2118	Cell Signaling Technology
IRDye® 800 CW Goat anti-Mouse IgG	N/A	1:15000	goat	N/A	926-32210	LICORbio

Secondary Antibody						
IRDye® 680 RD Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody	N/A	1:15000	goat	N/A	926- 68071	LICORbio
IRDye® 800 CW Goat anti-Rat IgG Secondary Antibody	N/A	1:15000	goat	N/A	926- 32219	LICORbio