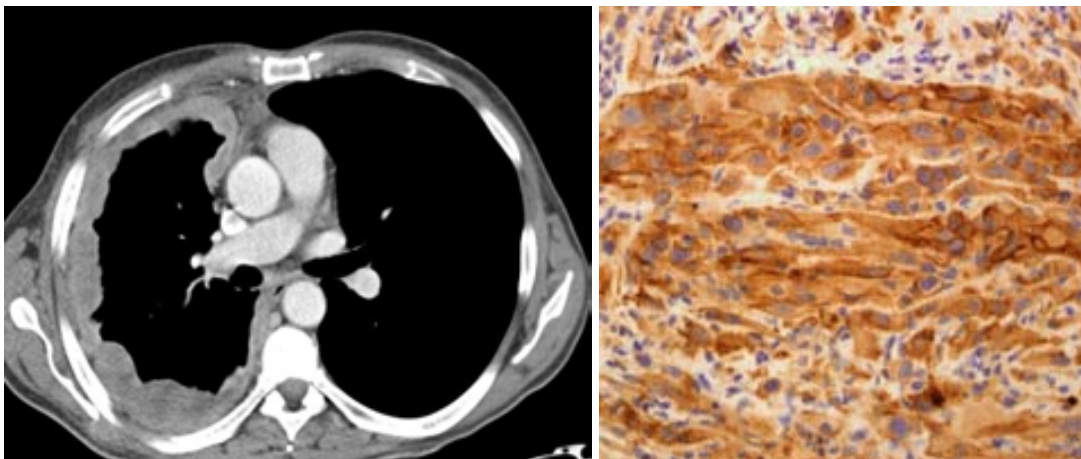


## TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado del Departamento de Medicina. UAB

Barcelona, Noviembre 2014

# *Análisis de la expresión de PD-L1 en una serie de pacientes con mesotelioma pleural maligno*



Autora: Susana María Cedrés Pérez

Directora: Dra Enriqueta Felip Font



# Análisis de la expresión de PD-L1 en una serie de pacientes con mesotelioma pleural maligno

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado del Departamento de Medicina. UAB

Barcelona, Noviembre 2014

## **Susana María Cedrés Pérez**

Servicio de Oncología Médica

Hospital Universitario Vall d'Hebron

Barcelona

Autora

## **Dra Enriqueta Felip Font**

Servicio de Oncología Médica

Hospital Universitario Vall d'Hebron

Barcelona

Directora

## **Dr Albert Selva O'Callaghan**

Departamento de Medicina Interna

Hospital Universitario Vall d'Hebron

Barcelona

Tutor

A mi hija



## **AGRADECIMIENTOS**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no hubiera sido posible llevarlo a cabo sin la colaboración inestimable de todos aquellos enfermos que tomaron parte del mismo, ni las enseñanzas de mis compañeros. En este sentido me gustaría resaltar la colaboración muy en particular de la Dra Enriqueta Felip Font quien ha contribuido no sólo al desarrollo de este trabajo sino a parte importante de mi formación a lo largo de mi vida profesional.

Sin duda mi profundo agradecimiento a los siguientes colaboradores:

- Dr Pablo Martínez, Dr Alex Martínez y Dr Alejandro Navarro por su apoyo y ánimo distendido que ameniza las horas de trabajo en el hospital.
- Dra Ana Belén Anguita y Dra Irene Sansano y su equipo por la realización e interpretación de las tinciones
- Dr Santiago Ponce, inestimable amigo y colega sin cuya participación no hubiera sido posible el desarrollo de este proyecto
- Marta Vilaró por el magnífico análisis estadístico
- Mi marido y mis padres por su confianza, calidad humana y paciencia infinita

## **Certificado de dirección**

Dra **Enriqueta Felip Font**, profesora asociada de Oncología Médica por la Universidad Autónoma de Barcelona

### **CERTIFICO**

Que **SUSANA MARIA CEDRÉS PÉREZ**, licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Oncología Médica, ha realizado bajo mi dirección el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral:

### **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 EN UNA SERIE DE PACIENTES CON MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO**

para presentarlo como Tesis Doctoral y optar así al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Estudiado y examinado dicho trabajo, considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido en sesión pública ante el Tribunal que se le designe.

Y, para que surta efecto donde corresponda, expido el presente certificado

Barcelona 1 de julio de 2014

**Fdo. Dra Enriqueta Felip Font**





## **Certificado del tutor**

Dr **Albert Selva O'Callaghan**, profesor titular de Medicina Interna por la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICO

Que **SUSANA MARIA CEDRÉS PÉREZ**, licenciada en Medicina y Cirugía y especialista en Oncología Médica, ha realizado bajo mi tutoría el Trabajo de Investigación correspondiente a la Tesis Doctoral:

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 EN UNA SERIE DE PACIENTES CON MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO**

para presentarlo como Tesis Doctoral y optar así al Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Estudiado y examinado dicho trabajo, considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido en sesión pública ante el Tribunal que se le designe.

Y, para que surta efecto donde corresponda, expido el presente certificado

Barcelona 1 de julio de 2014

**Fdo. Dr Albert Selva O'Callaghan**



## **ÍNDICE**

---

## ÍNDICE

### I INTRODUCCION

1. Mesotelioma pleural maligno (MPM)	2
1.1 Epidemiología	2
1.2 Etiología	4
1.2.1 Asbesto	4
1.2.2 Virus SV40	9
1.2.3 Radiación ionizante	10
1.2.4 Mecanismos moleculares del mesotelioma	10
1.2.5 Predisposición genética	11
1.3 Patología	12
1.4 Presentación clínica	15
1.5 Estudio de extensión	16
1.6 Marcadores tumorales	18
1.7 Estadificación	19
1.8 Factores pronósticos	24
1.9 Tratamiento	28
2. Inmunidad relacionada con el cáncer	31
2.1 Sistema de inmunovigilancia tumoral	34
2.2 Mecanismos inmunosupresores	36
2.3 Linfocitos T reguladores	38
2.4 Linfocitos T Infiltrantes	39
2.5 Superfamilia de moléculas co-señaladoras	41
2.5.1 Eje del CD28-CTLA4-ICOS	43
2.5.2 Vía B7H1(PD-L1), B7DC y PD1	46
2.5.3 Anticuerpos hacia la vía de PD1-PD-L1	50
2.6 Relevancia de la inmunidad en MPM	54
2.6.1 Elementos inmunológicos del MPM	56
2.7 Inmunoterapia en MPM	59
2.7.1 Inmunoterapia no específica	60
2.7.2 Inmunoterapia dirigida	64
2.7.3 Combinación de quimio-immunoterapia	65
2.7.4 Inhibidores de CTLA4	67
2.7.5 Inhibidores de la vía PD1-PD-L1 en MPM	68

2.8 Detección de la expresión de PD-L1	69
II HIPÒTESIS DE TRABAJO	73
III OBJETIVOS	75
1.1 Objetivo primario	76
1.2 Objetivos secundarios	76
IV MÉTODOS	77
1. Ámbito de desarrollo	78
2. Pacientes del estudio	78
3. Procedimientos del estudio	82
3.1 Anticuerpo utilizado	82
3.2 Selección de muestras	82
3.3 Técnicas de inmunohistoquímica	82
3.4 Interpretación de las muestras	83
3.5 Recogida de información y valoración clínica de los resultados	84
4. Análisis estadístico	85
5. Consideraciones éticas	86
V RESULTADOS	87
1. Análisis descriptivo de los pacientes con mesotelioma	88
2. Análisis de supervivencia y factores pronósticos	95
2.1 Supervivencia según histología	96
2.2 Supervivencia según respuesta a la quimioterapia	97
2.3 Supervivencia según el hábito tabáquico	98
2.4 Supervivencia según contacto amianto	99
2.5 Supervivencia según la localización del tumor	100
2.6 Supervivencia según el estadio clínico	101
2.7 Supervivencia según la edad	102
2.8 Supervivencia según el sexo	103
2.9 Supervivencia según el estado funcional	104
3. Análisis de la expresión de PD-L1	105
4. Asociación de PD-L1 con variables clínicas	113
5. Análisis de la expresión de PD-L1 y supervivencia	117
VI DISCUSIÓN	127
1. Análisis descriptivo de los pacientes con mesotelioma	128

---

2. Análisis de factores pronósticos	131
3. Análisis de la expresión de PD-L1	135
4. Asociación de PD-L1 con variables clínicas	139
5. Análisis de la expresión de PD-L1 y supervivencia	140
6. Limitaciones del estudio	144
VII CONCLUSIONES	145
VIII BIBLIOGRAFÍA	147

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de la T en el MPM	19
Tabla 2. Definición de la N para el MPM	21
Tabla 3. Definición de la N para el MPM	21
Tabla 4. Estadios anatómicos del sistema TNM	22
Tabla 5. Factores pronósticos del grupo EORTC	25
Tabla 6. Factores pronósticos del grupo CALGB	25
Tabla 7 . Principales biomarcadores pronósticos	27
Tabla 8. estudios de quimioterapia en pacientes MPM	30
Tabla 9. Recomendaciones del tratamiento guías NCCN	31
Tabla 10. Inhibidores de PD1-PD-L1	53
Tabla 11. Estatus funcional (ECOG)	81
Tabla 12. Características pacientes PD-L1 positivos	112
Tabla 13. Asociación PD-L1 con histología	113
Tabla 14. Asociación PD-L1 con sexo	113
Tabla 15. Asociación PD-L1 con hábito tabáquico	114
Tabla 16. Asociación PD-L1 con la exposición al amianto	114
Tabla 17. Asociación PD-L1 con ratio neutrófilo-linfocitario (NLR)	114
Tabla 18. Asociación PD-L1 con estadio clínico	115
Tabla 19. Asociación PD-L1 con respuesta a quimioterapia	115



	Índice
Tabla 20. Asociación con el infiltrado linfocitario	116
Tabla 21. Asociación PD-L1 con CD8	116
Tabla 22. Asociación PD-L1 con CD4	125
Tabla 23. Modelo de regresión de Cox	125
Tabla 24. Anticuerpos para la detección de PD-L1	137
Tabla 25. Estudios de análisis pronóstico de PD-L1 en tumores sólidos	142

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de MPM en EEUU entre 1975 y 2007. SEER	3
Figura 2. Incidencia de MPM en UK entre los años 2009-2011	4
Figura 3. Incidencia de MPM en UK entre los años 2009-2011	5
Figura 4. Cuerpos de asbesto rodeado de macrófagos en el alveolo	8
Figura 5. Mecanismos de carcinogénesis inducida por el asbesto	9
Figura 6. Mutaciones somáticas en mesotelioma	11
Figura 7. Imagen inmunohistoquímica de mesotelioma epitelioide	14
Figura 8. Imagen inmunohistoquímica de mesotelioma sarcomatoide	14
Figura 9. TAC de tórax	16
Figura 10. Imagen de PET	17
Figura 11. Representación anatómica del TNM	23
Figura 12. Gráfica de supervivencia por estadios	28
Figura 13. Características del cáncer	32
Figura 14. Modulación inmune del linfocito activado	34
Figura 15. Mecanismos de evasión inmune	37
Figura 16. Diagrama de activación del linfocito T regulador	39
Figura 17. Señales co-estimuladoras e inhibitorias del linfocito T	42
Figura 18. Cascada de señalización del receptor CD28	44
Figura 19. Mecanismo de acción de la vía PD1-PD-L1	47

---

Figura 20. Imagen de ejemplos de tinción positiva PD-L1 en melanoma, cáncer renal y cáncer de pulmón	49
Figura 21. Mecanismos de bloqueo de PD1 y PD-L1	50
Figura 22. Mecanismos de carcinogénesis por erionita	57
Figura 23. Imagen de modelo de vacuna de células dendríticas	61
Figura 24. Imagen de modelo de vacunas con interferón	63
Figura 25 Expresión positiva de PD-L1 con el anticuerpo de Genentech	70
Figura 26. Tinción en pulmón con el anticuerpo PD-L1 (E1L3N™)XP®	71
Figura 27. Diagrama de distribución por sexo	88
Figura 28. Diagrama de distribución por hábito tabáquico	89
Figura 29. Diagrama de distribución por contacto amianto	89
Figura 30. Diagrama de distribución por ECOG	90
Figura 31. Diagrama de distribución por derrame pleural	90
Figura 32. Diagrama de distribución por NLR	91
Figura 33. Diagrama de distribución por estadio clínico	91
Figura 34. Diagrama de distribución por histología	92
Figura 35. Diagrama de distribución por tratamiento	92
Figura 36. Diagrama de distribución por respuesta al tratamiento	93
Figura 37. Gráfica de supervivencia global	95
Figura 38. Supervivencia según histología	96
Figura 39. Supervivencia según respuesta a la quimioterapia	97
Figura 40. Supervivencia según hábito tabáquico	98

Figura 41. Supervivencia según contacto amianto	99
Figura 42. Supervivencia según localización del tumor	100
Figura 43. Supervivencia según estadio clínico	101
Figura 44. Supervivencia según edad	102
Figura 45. Supervivencia según sexo	103
Figura 46. Supervivencia según ECOG	104
Figura 47. Distribución de pacientes evaluados para PD-L1	105
Figura 48. Positividad de PD-L1	106
Figura 49. Intensidad de la tinción de PD-L1	106
Figura 50. Imagen de tinción positiva débil de PD-L1	107
Figura 51. Imagen de tinción positiva moderada de PD-L1	107
Figura 52. Imagen de tinción positiva intensa de PD-L1	108
Figura 53. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en membrana	108
Figura 54. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en citoplasma	109
Figura 55. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en infiltrado inflamatorio	109
Figura 56. Diagrama de porcentaje celular de positividad de PD-L1	110
Figura 57. Diagrama de distribución de TIL	111
Figura 58. Supervivencia en pacientes PD-L1 positivo y negativo	117
Figura 59. Supervivencia por intensidad PD-L1 débil/moderada-intensa	118
Figura 60. Supervivencia PD-L1 negativos y moderado-intenso	119
Figura 61. Supervivencia PD-L1 negativos y positivos intenso	120
Figura 62. Supervivencia PD-L1 negativo-débil y moderado-intenso	121

Figura 63. Supervivencia en PD-L1 positivos según el porcentaje celular	122
Figura 64. Supervivencia según el infiltrado CD4	123
Figura 65. Supervivencia según el infiltrado CD8	124

## **ACRÒNIMOS**

APC: Célula Presentadora de Antígenos

CTL: Linfocitos T Citotóxico

ECOG: escala funcional del Grupo Cooperativo de Oncología del Este

EPP: Neumonectomía Extrapleural Extrapericárdica

IASLC: Grupo Internacional para el estudio de Cáncer de Pulmón

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

MPM: mesotelioma pleural maligno

PD: pleurodecorticación

PD-1: Receptor de Muerte Programada

PD-L1: Ligando del Receptor de Muerte Programada

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

PS: Estado funcional

SEER: Encuesta de Epidemiología y Seguimiento

SUV: Índice de captación de glucosa

TAA: Antígenos Asociados a Tumor

TAC: Tomografía Axial Computerizada

TIL: Linfocito T Infiltrante

TNM: Tumor, Ganglio linfático, Metástasis

Treg: Linfocito T Regulador



## **INTRODUCCIÓN**

---



## I INTRODUCCIÓN

### 1. Mesotelioma pleural maligno ( MPM)

#### 1.1 Epidemiología

El mesotelioma maligno es un tumor muy agresivo que surge de la superficie de las células serosas de la pleura, peritoneo y cavidad peritoneal [1]. La enfermedad se caracteriza por un largo periodo de latencia desde la exposición al tóxico hasta el desarrollo de la enfermedad.

El mesotelioma pleural maligno (MPM) se considera una neoplasia emergente ya que era raramente diagnosticada antes de la mitad del siglo XX. La incidencia ha aumentado rápidamente desde 1970, y en la actualidad se estima que ocurren 3000 nuevos casos al año en Estados Unidos [2,3]. Estos datos reflejan la extensión de la exposición ocupacional del asbesto, principal causante del MPM, en el mundo occidental entre los años 1940 hasta 1970, así como la latencia de aproximadamente 30 años desde la exposición hasta la manifestación típica del MPM. A finales de los 1990s los gobiernos de muchos países desarrollados prohibieron o restringieron de manera importante el uso de asbesto. A pesar de esta prohibición en las ventas de asbesto la incidencia de MPM se espera que aumente debido al reciente auge renovador, especialmente en Australia, y los largos periodos de latencia entre la exposición y el diagnóstico [4,5]. En Reino Unido en 2008 fallecieron 2249 personas por MPM y la incidencia de la enfermedad está aumentando en ese país debido al contenido de asbesto en la construcción de viviendas y edificios públicos. Además numerosos países en desarrollo continúan utilizando el asbesto.

En Estados Unidos el pico de incidencia se ha alcanzado durante la última década, pero se espera un pico mundial de incidencia en el año 2020 [6]. En España no se dispone de registros nacionales sobre la incidencia y mortalidad de la enfermedad y se estima actualmente que la tasa de incidencia se sitúa en

torno a los 0,35 casos por cada 100.000 habitantes-año y es responsable del fallecimiento de 5 personas por cada millón de habitantes. Se estima en España que las muertes debidas al MPM por la exposición ocupacional al asbesto continuarán hasta el año 2014 [7]. En Barcelona la tasa de mortalidad por 100.000 habitantes durante el periodo 1983-1990 fue de 0,83 para los hombres y 0,47 para las mujeres, con un aumento significativo en las áreas de El Prat de Llobregat y Cerdanyola, áreas donde existen empresas productoras de fibrocemento [8]

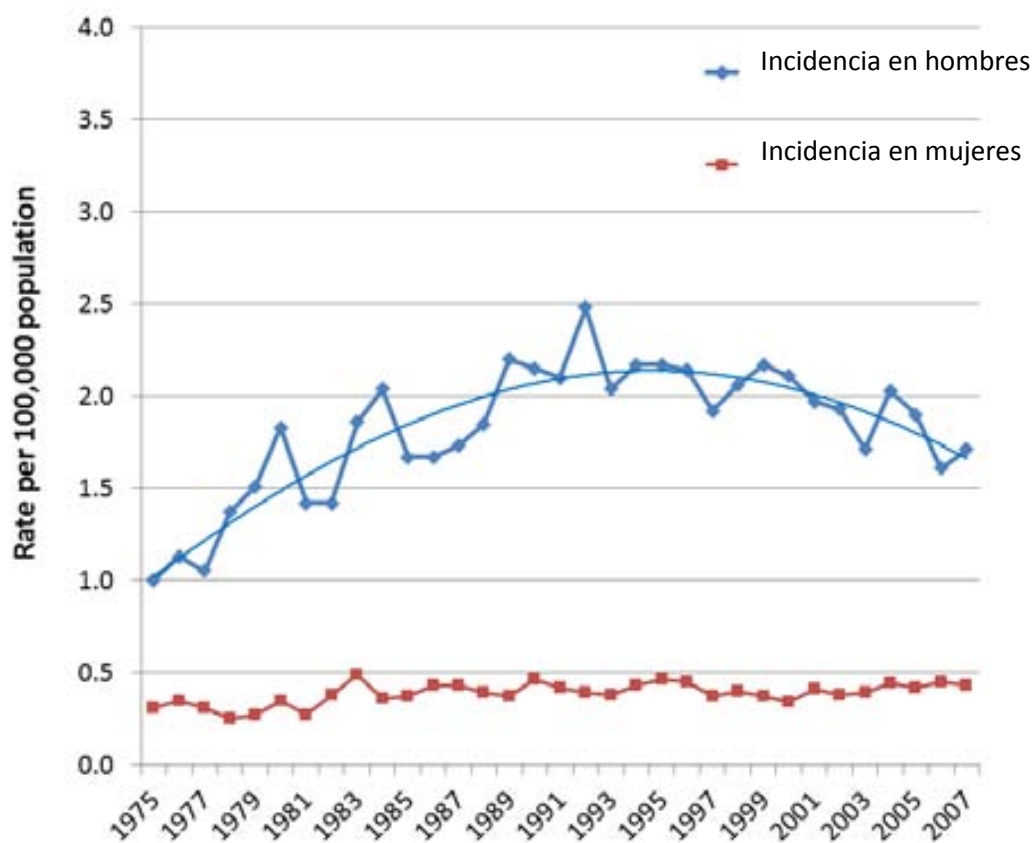
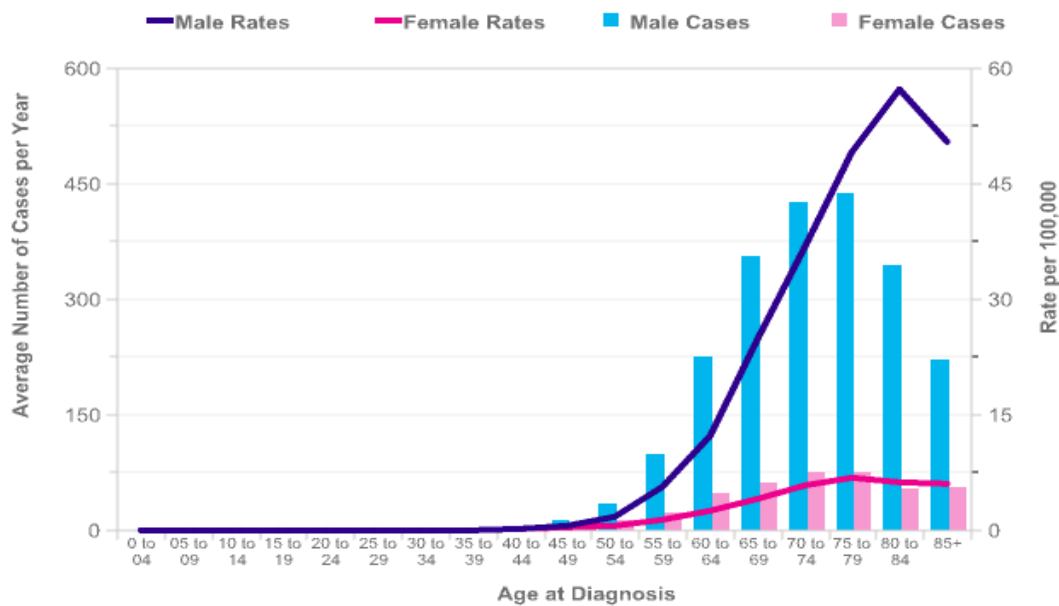


Figura 1. Gráfica de incidencia de MPM en EE.UU entre 1975 y 2007. SEER [9]



**Figura 2. Grafica de incidencia de MPM en UK entre los años 2009-2011 [10]**

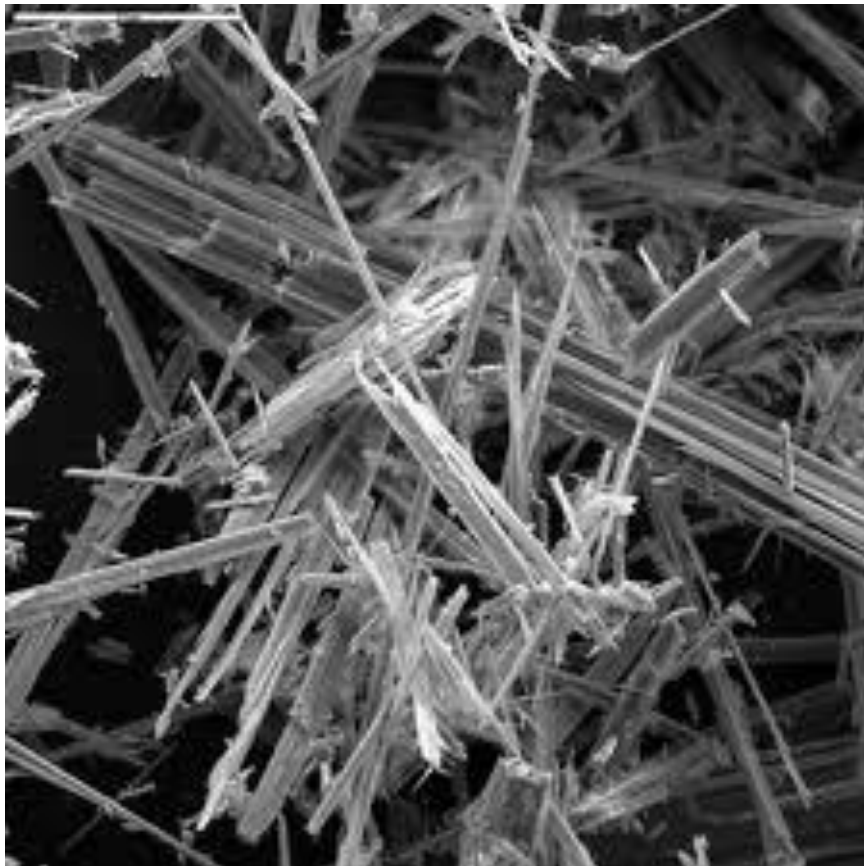
## 1.2 Etiología

La principal causa del MPM es la exposición a las fibras de asbesto, al que se pueden atribuir aproximadamente el 80% de los MPM. Sin embargo estudios recientes analizando la epidemia del MPM en Turquía sugieren que la predisposición genética puede ser relevante para el desarrollo de la enfermedad. Otras causas sospechosas o cocarcinógenos incluyen fibras minerales como la erionita, el virus SV40 y la radiación ionizante [11].

### 1.2.1. Asbesto

Se estima que es responsable del 80 % de los casos de mesotelioma. El asbesto comprende un grupo de silicatos minerales que se presentan en diferentes formas. Materiales que usan fibras de asbesto han estado presentes desde tiempos ancestrales. En realidad, la palabra asbesto es derivada de un término griego que significa inextinguible o que nunca se apagará, una referencia a sus

propiedades resistentes al fuego. Precisamente son sus propiedades aislantes y de resistencia al calor y a la combustión las que convirtieron al asbesto en un material muy valioso en la industria. Se utiliza en la fabricación de cementos, tejados, revestimientos de piscinas, frenos de automóviles y construcción de barcos.



**Figura 3. Imagen de fibra de asbesto**

Existen dos tipos de exposición al asbesto, ocupacional y no ocupacional.

- Exposición ocupacional:

Referida a los trabajadores que intervienen en procesos de manufacturación de productos derivados del asbesto. Los esfuerzos para controlar la exposición ocupacional al asbesto pueden resultar en un descenso significativo en la incidencia de MPM. Sin embargo, debido al largo periodo de latencia entre la exposición y el desarrollo de la enfermedad se estima que el descenso en la incidencia de la enfermedad ocurrirá muy lentamente. Como ejemplo en Estados Unidos en torno a 8 millones de personas han estado expuestas de manera ocupacional al asbesto durante los últimos 50 años. Se estima que el 8% de los expuestos morirá de fallo respiratorio secundario a la asbestosis. La posibilidad de un trabajador del asbesto de fallecer de una neoplasia es del 50% comparado con 18% de la media de los americanos, la gran mayoría primarios de pulmón o MPM. El riesgo de desarrollar un MPM en los trabajadores del asbesto es del 10%. Además parece existir una relación dosis respuesta entre la exposición y el MPM [12].

- Exposición no ocupacional:

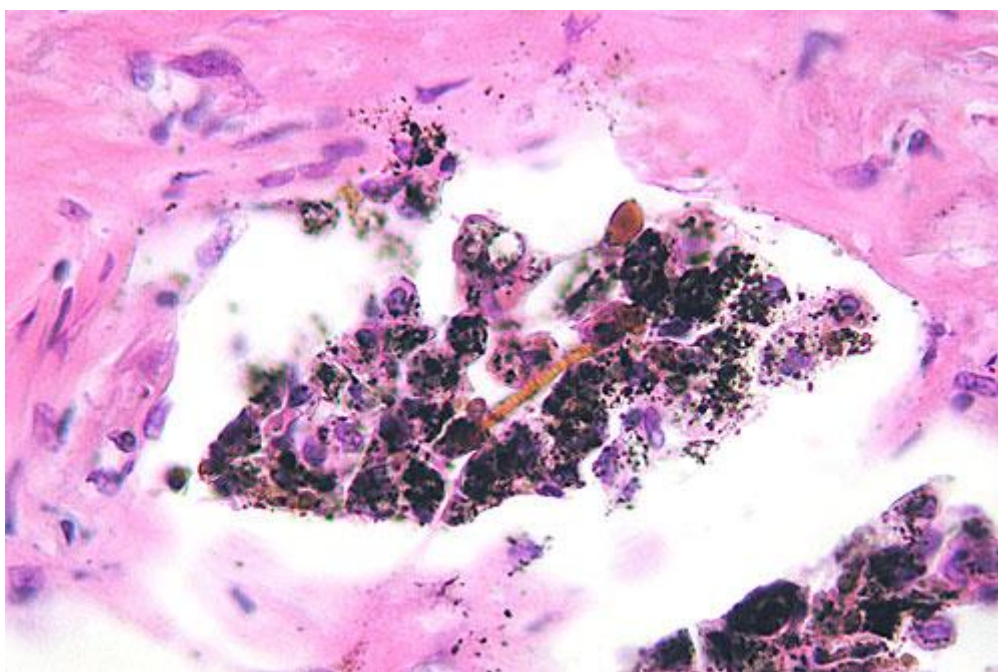
La exposición no ocupacional, ambiental, puede contribuir al incremento del MPM. Como ejemplo se ha observado en áreas rurales de Grecia, Bulgaria y Turquía, donde el suelo contiene altos niveles de fibras de asbesto, mayor incidencia de MPM que parece ser secundario a la larga exposición no ocupacional. En California se ha observado un incremento del riesgo de MPM en relación a la proximidad de un depósito natural de asbesto [13,14].

La relación entre la exposición al asbesto y el MPM fue establecida en 1960 por Wagner que reportó 33 casos de MPM que ocurrieron en un periodo de tiempo en un área del Sur de África donde se extraía la crocidolita [15]. Posteriormente

otros autores reportaron la relación entre la exposición al asbesto y la presentación de MPM en áreas industriales de Nueva York, en trabajadores de varias industrias que manejan el asbesto [16,17].

Aunque la relación asbestos-MPM es bien reconocida, se estima que sólo el 5% de los trabajadores expuestos al asbesto desarrollan la enfermedad sugiriendo que múltiples eventos genéticos son necesarios para la transformación maligna de las células mesoteliales expuestas al asbesto [18].

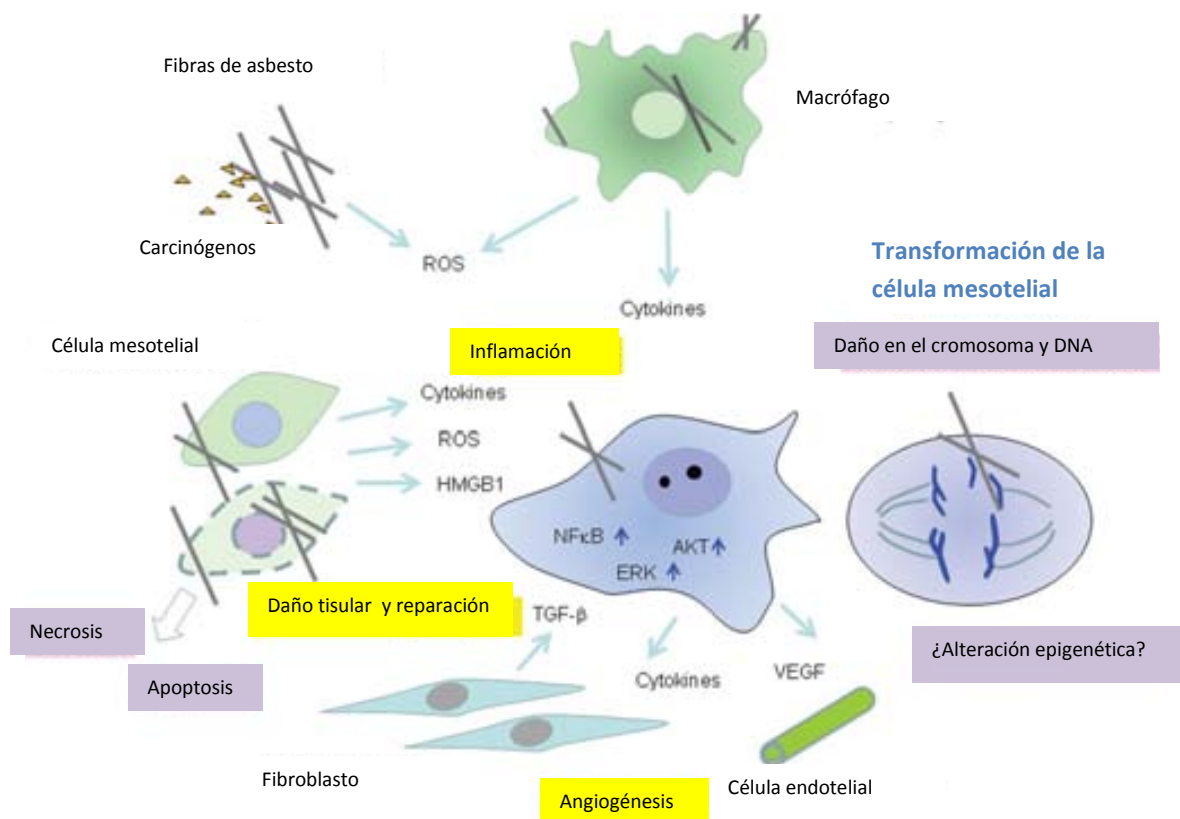
La patogénesis de la enfermedad a raíz de la exposición al asbesto no es bien conocida. Se piensa que cuando las fibras de asbesto inhaladas alcanzan el alveolo, las fibras más pequeñas son fagocitadas y eficazmente eliminadas del pulmón. Sin embargo, las fibras más largas no son fácilmente digeridas. Estas fibras pueden eventualmente alcanzar la pleura vía vasos linfáticos o por extensión directa, donde llevan a la formación de placas pleurales, fibrosis y finalmente la aparición del mesotelioma.



**Figura 4. Imagen de cuerpos de asbesto rodeados de macrófagos en el alveolo**

Es difícil entender cómo ocurren las alteraciones carcinogénicas del asbesto dado el largo periodo de latencia desde la exposición a las fibras de asbesto hasta el desarrollo de la enfermedad (30 años de media tras la exposición). Se han propuesto dos teorías sobre los posibles mecanismos que ocurren en este periodo de tiempo y que desencadenan el desarrollo de la enfermedad. Una teoría sugiere que las células se transforman en malignas tan pronto como contactan con el asbesto, pero que pasan años hasta que el tumor crece [18]. Esto se ha considerado bastante improbable dado que no se ha detectado una fase pre-invasiva y es un tumor de rápido crecimiento. La otra teoría considera que el asbesto induce alteraciones genéticas en las células mesoteliales en un largo periodo de tiempo que ocasionalmente pueden llevar a la transformación maligna. Esto ocurre con genes regulatorios como *INK4a/ARF* que está deletado o silenciado en el MPM [18].

Numerosos modelos experimentales demuestran la capacidad carcinógena del asbesto [19]. Los mecanismos responsables de la carcinogénesis se relacionan con la secreción de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) por las células mesoteliales y macrófagos expuestos al asbesto que llevan a la activación del factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) [20]. En la pleura las fibras de asbesto pueden causar cambios mutagénicos que llevan a roturas en la cadena de DNA. La actividad del NF $\kappa$ B permite a las células mesoteliales que han contactado con el asbesto sobrevivir y transformarse en malignas. Si no se induce la actividad NF $\kappa$ B las células mesoteliales mueren como resultado de la exposición al asbesto.



**Figura 5. Posibles mecanismos de carcinogénesis inducida por el asbesto. Adaptada de Sekido Y [21].**

### 1.2.2. Virus SV40

El SV40 es un poliomavirus identificado en varios tumores. En la década de los 60 el SV40 contaminó vacunas de la polio. Estas vacunas se administraron en numerosos países, incluyendo Estados Unidos, donde entre el 90% de los niños y el 60% de los adultos recibieron al menos una dosis de la vacuna contaminada. En modelos animales, tras la inoculación del SV40 la incidencia del MPM es del 100%. A pesar de la evidencia respecto a los efectos biológicos del SV40 en las células mesoteliales, existe considerable escepticismo en la comunidad científica respecto a la relación causal entre la presencia del virus SV40 y el desarrollo del MPM [22]



### 1.2.3 Radiación ionizante

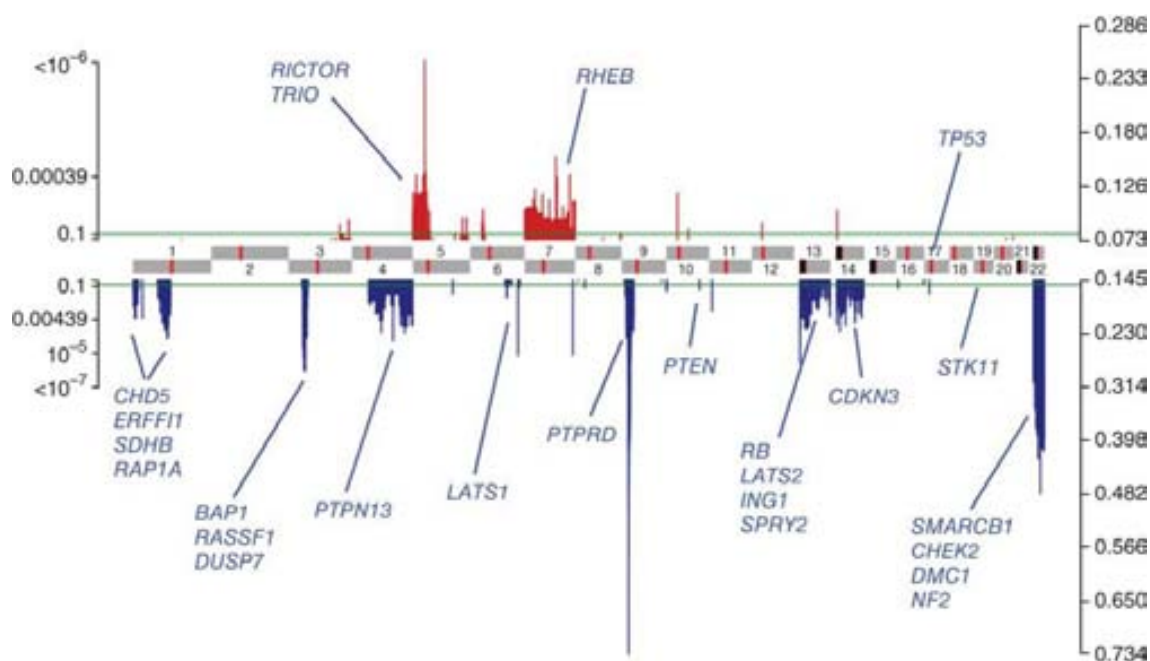
La radiación ionizante también puede ser un factor de riesgo para el desarrollo del MPM. Dos largos estudios de la SEER encontraron que pacientes supervivientes a linfomas presentaban un aumento de riesgo de MPM y este aumento se limitaba a los individuos que habían recibido radioterapia como parte de su tratamiento [2,23].

### 1.2.4 Mecanismos moleculares del mesotelioma

Estudios en líneas celulares y también en modelos animales de MPM han demostrado eventos genéticos y epigenéticos que contribuyen a un proceso de carcinogénesis de las fibras minerales. Estos eventos incluyen la inactivación de genes supresores de tumores, la modulación de vías de señales de transducción, la evasión de la apoptosis y la inhibición de la degradación de la vía ubiquitina-proteosoma:

- Los receptores tirosina quinasa están frecuentemente activados en las células mesoteliales y su activación lleva a la sobreexpresión de la vía de Raf-MEK y PI3K, que son cruciales para la proliferación y supervivencia de las células [21].
- El gen supresor más frecuentemente inactivado en el MPM es el CDKN2/ARF, localizado en el cromosoma 9p21.3 y que regula la inactivación de la proteína retinoblastoma y p53, ambos supresores tumorales [24].
- El gen de la neurofibromatosis 2 (NF2) codifica una proteína supresora de tumores, merlin, miembro de las proteínas de unión del citoesqueleto. Se ha demostrado que el 40-50% de MPM tienen una mutación inactivadora de NF2 [25].
- La vía de señalización del Hippo regula el tamaño de los órganos, su desarrollo y diferenciación y la reparación de tejidos regulando la división celular y promoviendo la apoptosis. Alteraciones en esta vía se han identificado en modelos de líneas celulares en MPM [26].

- BAP1 regula las histonas y factores de transcripción relacionados con el desarrollo de tumores. En un estudio in vitro se encontraron mutaciones inactivadoras de BAP1 en un cuarto de los tejidos de MPM testados y otro estudio identificó mutaciones germinales en dos familias con alta incidencia de MPM [27,28]. La pérdida de BAP 1 forma parte de un síndrome hereditario de susceptibilidad al cáncer que asocia con melanoma ocular. La pérdida de BAP1 puede predisponer al cáncer relacionado con la exposición al asbesto. Se ha propuesto que testar las mutaciones de este gen podría utilizarse para identificar a la población en riesgo.



**Figura 6. Mutaciones somáticas en mesotelioma. Adaptada de Carbone M [27]**

### 1.2.5 Predisposición genética

Estudios recientes indican que en algunos individuos puede existir una predisposición genética al mesotelioma. En el año 1978 se descubrió una epidemia sin precedentes en tres pueblos de la Capadocia, Turquía, donde más

---

del 50% de las muertes eran debidas al MPM [29]. Estudios mineralógicos relacionaron la epidemia con la exposición a las fibras de erionita, un tipo de fibra zeolita que se encuentra con frecuencia en la región. La erionita se considera la fibra mineral más potente para el desarrollo del mesotelioma. Inicialmente la epidemia en Capadocia se asoció con la exposición a erionita contenida en las piedras utilizadas para la fabricación de las casas en esta región. Posteriormente se demostró que el mesotelioma ocurría sólo en ciertas familias. Estudios han confirmado que la causa de la epidemia de MPM en Capadocia es una predisposición genética a la carcinogénesis inducida por la erionita, la cual se transmite de modo autosómico dominante. Sin embargo, entre los habitantes expuestos a las fibras, la aparición de MPM es más frecuente en ciertas familias [29]. Estos hallazgos sugieren que la genética juega un papel en el desarrollo del MPM.

### **1.3 Patología**

El MPM surge de células mesoteliales pluripotenciales que son capaces de diferenciarse en tres tipos: epitelial o epitelioide (morfología epitelial), sarcomatoide (morfología de sarcomatoide en forma de huso) y mixto o bifásico (morfología combinada) [30]. La distinción entre estos subtipos es importante de cara al pronóstico y la respuesta a los tratamientos.

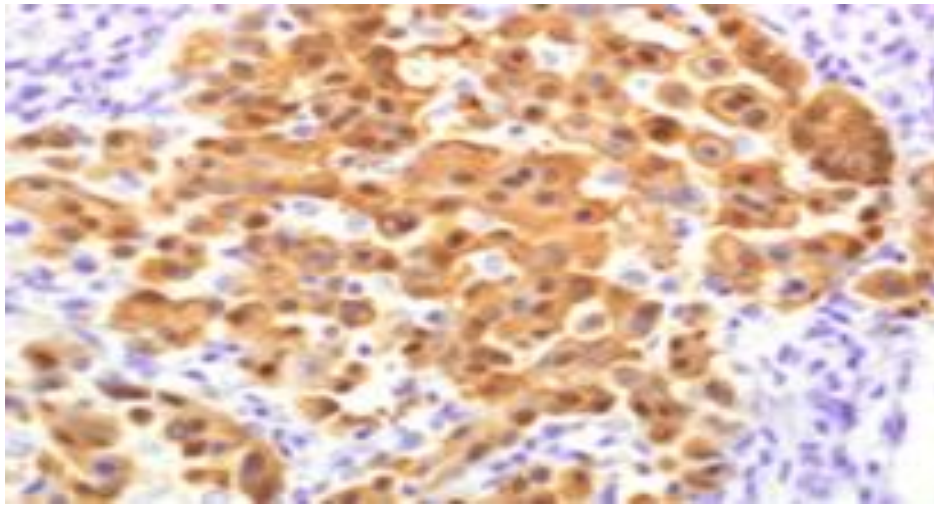
El tipo epitelial representa el 50-60% de todos los casos y es el de mejor pronóstico asociándose a una mediana de supervivencia de más de dos años desde el diagnóstico. Los patrones histológicos de este tipo incluyen el tubulopapilar, acinar y adenomatoso. Los MPM epiteliales son difíciles de distinguir de las metástasis pleurales de otros tumores.

El mesotelioma sarcomatoide representa el 10% de los casos y la mediana de supervivencia es inferior al año. Este subtipo está compuesto por células espinosas que imitan a los tumores mesenquimales. El mesotelioma desmoplásico es considerado un subtipo del mesotelioma sarcomatoide. Los sarcomas y el histiocitoma fibroso maligno producen una infiltración similar a los MPM, siendo difícil el diagnóstico diferencial entre ambas entidades.

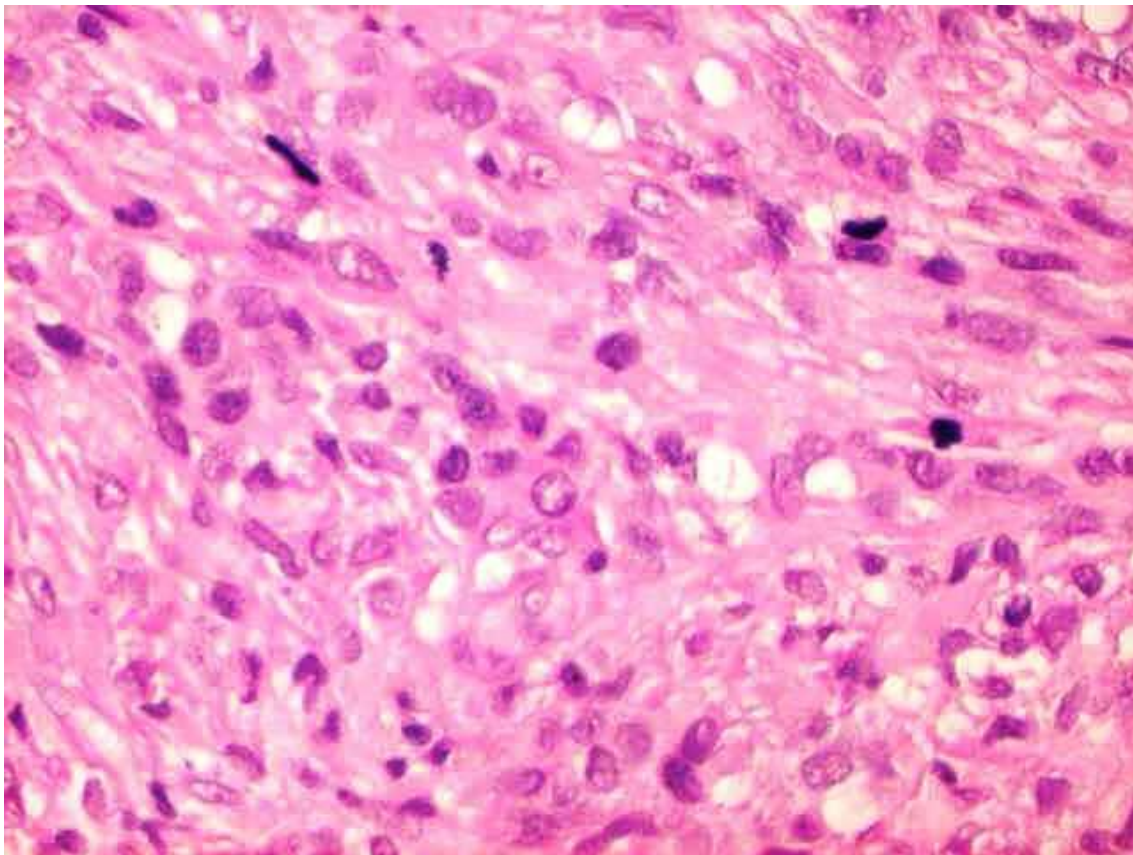
El mesotelioma mixto presenta características combinadas del epitelioide y sarcomatoide.

Además de ser un tumor raro, salvo en áreas epidemiológicas concretas, el diagnóstico histológico del mesotelioma es extremadamente difícil por lo que se recomienda remitir estos casos a patólogos con amplia experiencia. La imagen típica es la del crecimiento del tumor formando hojas sobre las células epiteliales, sin embargo con frecuencia su crecimiento se confunde con el de un carcinoma. En la etapa inicial se presenta como múltiples nódulos pequeños que son más pronunciados en la pleura parietal. Cuando el tumor progresa los nódulos confluyen hasta formar un anillo de tumor que fusiona la pleura parietal y la visceral. En etapas más avanzadas el tumor típicamente ocupa todo el pulmón y se extiende hacia las fisuras interlobares. Las estructuras adyacentes pueden estar afectas desde etapas precoces, con invasión de la pared torácica, pericardio y diafragma. Las metástasis más frecuentes son en el pulmón, hígado, suprarrenales y huesos.

Para el diagnóstico definitivo es necesaria la confirmación con marcadores de inmunohistoquímica. No existe un sólo marcador que tenga alta especificidad y sensibilidad, y por lo tanto se utiliza un panel de marcadores positivos y negativos. Se recomienda evaluar una combinación de marcadores que apoyan el diagnóstico de MPM (panqueratina, citoqueratina 5/6, calretinina y WT1) y marcadores que excluyen el diagnóstico (CEA, CD15, Ver-EP4, Moc-31, TTF1, B72.3).



**Figura 7. Imagen inmunohistoquímica de mesotelioma epitelioide (40x)**



**Figura 8. Imagen inmunohistoquímica de mesotelioma sarcomatoide (40x)**

#### **1.4 Presentación clínica**

La edad de presentación es de 50-70 años debido al largo periodo de latencia desde la exposición al asbesto (unos 30 años de media). Es más frecuente en hombres (ratio 5:1) y trabajadores de sectores de la construcción, astillería y áreas industriales.

La mayoría de los pacientes se presentan con síntomas pulmonares de aparición progresiva que se manifiestan generalmente cuando la enfermedad está avanzada.

Los síntomas de presentación que aparecen en más de la mitad de los pacientes son disnea, tos y dolor torácico debido a la extensión de la enfermedad intratorácica. Los síntomas pueden estar presentes varios meses previos al diagnóstico, oscilando la duración de los síntomas desde pocas semanas hasta 2 años previos a la fecha de diagnóstico. El dolor torácico pleurítico de localización posterolateral es el síntoma más frecuente, siendo el síntoma de debut en aproximadamente el 70% de pacientes. La disnea está presente en un 50-70% de los pacientes. En más del 90% de los casos se evidencia derrame pleural en las pruebas de imagen. La localización derecha es más frecuente que la izquierda. La presencia de metástasis a distancia era considerada un evento tardío y poco habitual, pero desde el uso del PET se detectan metástasis a distancia entre el 5-25% de los pacientes al diagnóstico [31].

La evolución natural de la enfermedad es la aparición de complicaciones por afectación local. La morbimortalidad del MPM se debe a la invasión local. Los pacientes presentan disnea y dolor torácico cuando el tumor oblitera el espacio pleural. La invasión local de estructuras vecinas ocasiona disfagia, disfonía, compresión medular y síndrome de vena cava superior. Las metástasis más frecuentes pueden ocurrir en el pulmón contralateral, cerebro, huesos y glándulas suprarrenales, entre otros. La mayoría de pacientes fallecen por extensión local y fallo respiratorio.

El proceso diagnóstico se completa con el examen físico en busca de derrame pleural o masas palpables en la pared torácica. En el análisis de laboratorio frecuentemente se observan anemia y trombocitosis, considerados además factores de mal pronóstico.

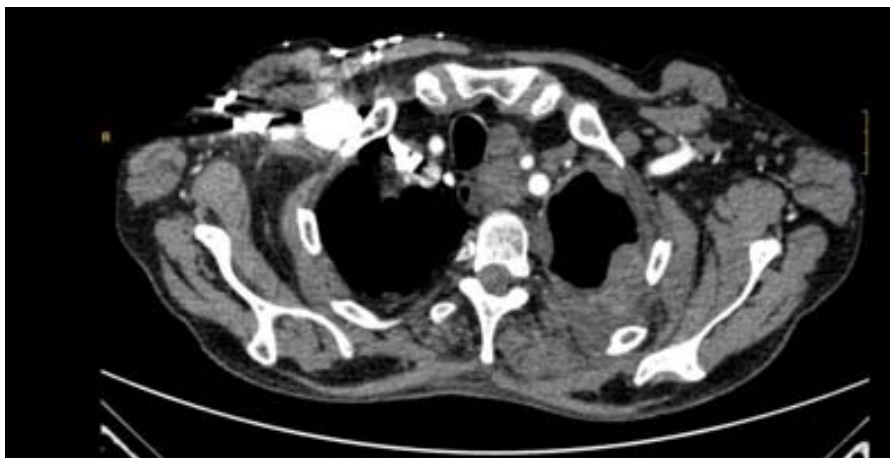
El diagnóstico anatomopatológico inicial mediante citología obtenida por toracocentesis y la biopsia pleural cerrada se considera que es insuficiente para obtener el diagnóstico definitivo. Las biopsias obtenidas por videotoracoscopia obtienen diagnóstico en 98% de los casos.

### **1.5 Estudio de extensión**

No existe consenso sobre las pruebas complementarias recomendables para completar el estadiaje del MPM.

La radiografía de tórax puede detectar la presencia de derrame pleural y, en ciertas ocasiones, nodularidad pleural.

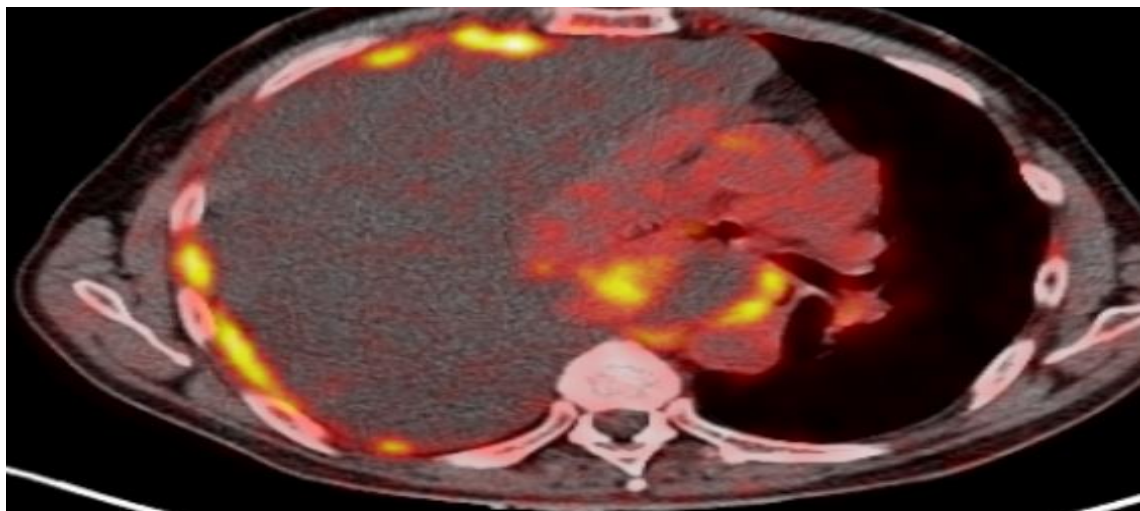
La tomografía axial computerizada (TAC) es la prueba principal para el estadiaje del MPM. Mediante esta técnica se define el grosor pleural (difuso o nodular), la presencia de derrame pleural y adenopatías. Las imágenes obtenidas por el TAC sirven para planificar la reseccabilidad del MPM.



**Figura 9. TAC de tórax mostrando típico engrosamiento pleural nodular circunferencial.**



El papel de la tomografía por emisión de positrones (PET) no está definido en la estadificación del MPM. Sin embargo, estudios recientes muestran que el PET tiene valor en la estadificación del mesotelioma. Dos estudios de series de pacientes han demostrado que el PET parece ser la prueba más fiable para la evaluación inicial del MPM. En una serie de 42 pacientes clasificados por TAC como ausencia de T4 o M1, el 29% de los casos se reclasificaron como T4 o M1 por PET. Otro estudio de 54 pacientes demostró que el PET/TC era más eficaz que el TAC, resonancia magnética o PET en los estadios II y III [32].



**Figura 10. Imagen de PET que muestra captación nodular circunferencial típica de MPM**



## **1.6 Marcadores tumorales**

Se han descrito numerosos marcadores que están elevados en suero o líquido pleural en el MPM, sin embargo ninguno de ellos ha demostrado suficiente validez en el diagnóstico ni en la monitorización de la respuesta al tratamiento. Los marcadores de mayor interés son la fibulina-3, mesotelina y osteopontina.

La fibulina-3 es una glicoproteína extracelular que se detecta en plasma. Sus niveles elevados permiten distinguir con alta especificidad y sensibilidad (97% y 96% respectivamente) los pacientes con MPM de aquellos con historia de exposición al asbesto, pero sin mesotelioma o de aquellos con otros tumores. Se requieren más estudios para evaluar el papel de la fibulina-3 en plasma como biomarcador de diagnóstico precoz y monitorización a los tratamientos [33].

La mesotelina es una glicoproteína que se expresa en la superficie de las células mesoteliales normales y se sobreexpresa en el MPM [35]. Múltiples estudios y un metaanálisis han demostrado que el péptido soluble de la mesotelina tiene una sensibilidad que oscila entre el 16% al 68%, dependiendo del criterio específico, para positividad. La utilidad de este marcador está limitada a los pacientes con MPM epitelioide o mixto y no para los casos sarcomatoides [36].

La osteopontina es una glicoproteína que se expresa en diferentes tipos de tumores. En un estudio con 190 pacientes, los niveles de osteopontina eran mayores en pacientes con MPM que en pacientes con enfermedades no malignas relacionadas con el asbesto y en pacientes sin exposición al asbesto [37].

## 1.7 Estadificación

El sistema de estadificación utilizado en el MPM es el TNM (Tumor, Node, Metastasis) [38]. En este sistema se diferencian los estadios I y II que son potencialmente resecables, con afectación del diafragma o del parénquima pulmonar, pero sin diseminación a los ganglios linfáticos ni metástasis a distancia. El estadio III engloba los casos con diseminación ganglionar regional y el IV incluye los localmente avanzados irresecables, afectación ganglionar contralateral, supraclavicular y metástasis a distancia.

**Tabla 1. Definición de la T en el MPM**

<b>Tumor primario (T)</b>	
<b>TX</b>	El tumor primario no puede ser medido
<b>T0</b>	No evidencia de tumor primario
<b>T1</b>	Tumor limitado a la pleura parietal ipsilateral con o sin afectación de la pleura mediastínica y con o sin afectación pleural diafragmática
<b>T1a</b>	No afectación de la pleura visceral
<b>T1b</b>	Tumor que envuelve la pleura visceral
<b>T2</b>	Tumor que afecta la superficie pleurales ipsilaterales con al menos uno de los siguientes: Afectación del musculo diafragma Extensión hacia el parénquima pulmonar subyacente

<b>T3</b>	<p>Tumor localmente avanzado, pero resecable</p> <p>Tumor que afecta las superficies pleurales ipsilaterales con al menos uno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Afectación de la fascia endotorácica</li><li>Extensión a la grasa mediastínica</li><li>Foco solitario, completamente resecable que se extiende en los tejidos blandos de la pared torácica</li><li>Afectación no transmural del pericardio</li></ul>
<b>T4</b>	<p>Tumor localmente avanzado técnicamente irresecable</p> <p>Tumor que afecta las superficies pleurales ipsilaterales con al menos uno de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>Extensión difusa o multifocal de masas de tumor en la pared torácica, con o sin destrucción costal asociada</li><li>Extensión directa transdiafragmática del tumor al peritoneo</li><li>Extensión directa del tumor a la pleura contralateral</li><li>Extensión directa del tumor a órganos del mediastino</li><li>Extensión directa del tumor a la columna</li></ul> <p>Tumor que se extiende a través de la superficie interna del pericardio con o sin derrame pericárdico tumoral o tumor que envuelve el miocardio</p>

**Tabla 2. Definición de la N para el MPM**

<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
<b>Nx</b>	Los ganglios linfáticos no se pueden evaluar
<b>N0</b>	No ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en los ganglios broncopulmonares ipsilaterales o en los hiliares
<b>N2</b>	Metástasis en los ganglios subcarinales o en los mediastínicos ipsilaterales incluyendo la mamaria interna ipsilateral y ganglios peridiafragmáticos
<b>N3</b>	Metástasis en los ganglios mediastínicos contralaterales, mamaria interna contralateral. Ganglios supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales

**Tabla 3. Definición de la M en el MPM**

<b>Metástasis a distancia (M)</b>	
<b>M0</b>	No metástasis a distancia
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia

**Tabla 4. Estadios anatómicos del sistema TNM**

<b>Estadio I</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IA</b>	T1a	N0	M0
<b>Estadio IB</b>	T1b	N0	M0
<b>Estadio II</b>	T2	N0	M0
<b>Estadio III</b>	T1,T2	N1	M0
	T1,T2	N2	M0
	T3	N0,N1,N2	M0
<b>Estadio IV</b>	T4	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1




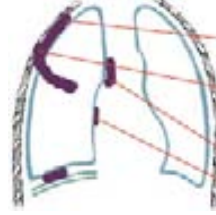
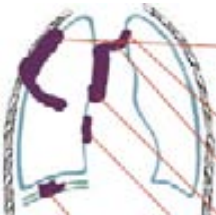
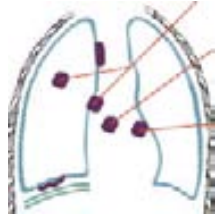
<p><b>Estadio IA</b> <b>T1aN0</b></p> 	<p><b>pT1a</b></p> <p>Tumor limitado a la pleura <b>parietal</b> ipsilateral incluyendo pleura <b>mediastínica</b> y <b>diafragmática</b> No afectación de la pleura visceral</p>	<p><b>Estadio Ib</b> <b>T1bN0</b></p> 	<p><b>pT1b</b></p> <p>Tumor que afecta la <b>pleura parietal ipsilateral</b>, incluyendo la pleura mediastínica y diafragmática. <b>Focos</b> de tumor que envuelven la pleura <b>visceral</b></p>
<p><b>Estadio II</b> <b>T2N0</b></p> 	<p><b>pT2</b></p> <p>Tumor que envuelve las superficies pleurales y al menos una de las siguientes: Tumor confluyente de la <b>pleura visceral</b> o extensión hacia el <b>parénquima pulmonar</b> subyacente Afectación del <b>diafragma</b></p>	<p><b>Estadio III</b> <b>Cualquier T3</b> <b>cualquier N1-N2</b></p> 	<p><b>pT3</b></p> <p>Tumor que afecta todas las superficies pleurales y al menos uno: <b>Fascia endotorácica</b> Foco solitario resecable en <b>partes blandas</b> de la pared torácica <b>Grasa mediastínica</b> Afectación no-transmural del <b>pericardio</b></p>
<p><b>Estadio IV</b> <b>Cualquier T4,cualquier N3,cualquier M1</b></p> 	<p><b>pT4</b></p> <p>Tumor que afecta todas las superficies pleurales y al menos uno: Extensión <b>difusa</b> o <b>masas multifocales</b> en la pared torácica Extensión directa en la <b>pleura contralateral</b> Extensión directa en la <b>columna</b> Extensión en <b>órganos del mediastino</b> Extensión a través del <b>pericardio</b> Extensión transdiafragmática al <b>peritoneo</b></p>		<p><b>pN</b></p> <p><b>N0:</b> no ganglios regionales <b>N1:</b> metástasis en ganglios bronquiopulmonares o hiliares ipsilaterales <b>N2:</b> metástasis subcarinales o mediastino ipsilateral incluyendo los de la mamaria ipsilateral <b>N3:</b> metástasis en el mediastino contralateral, mamaria interna contralateral, ganglios supraclaviculares</p> <p><b>pM</b></p> <p><b>M0:</b> no metástasis a distancia <b>M1</b> metástasis a distancia</p>

Figura 11. Representación anatómica del TNM. Adaptada de Rusch V [40]

## **1.8 Factores pronósticos**

Existen dos categorías pronósticas que usan una combinación de factores clínicos y patológicos: CALGB y EORTC [39,40].

El CALGB evalúa el impacto de las características clínicas en la supervivencia de 337 pacientes tratados con quimioterapia en estudios fases II. En el análisis multivariante los factores pronósticos que predicen peor supervivencia fueron la localización pleural (frente a peritoneal o pericárdica), LDH>500U/L, estado funcional (PS) deteriorado, dolor torácico, plaquetas mayores de 400000, histología no epitelial y edad mayor de 75 años. Se generaron seis subgrupos pronósticos con unas supervivencias que oscilan desde 1.4 a 13.9 meses.

El índice del EORTC revisó datos de 204 pacientes que entraron en cinco estudios consecutivos fase II. Clasifican a los pacientes en dos grupos pronósticos con una diferencia de supervivencia al año del 40% al 12% cuando se consideran cinco factores pronósticos (estado funcional deteriorado, leucocitos elevados, sexo masculino, subtipo sarcomatoide, y la certeza del diagnóstico).

**Tabla 5. Factores pronósticos del grupo EORTC**

	Variable	Supervivencia en meses
<b>Estado funcional</b>	Bueno (0)	10.7
	Malo (1-2)	7.2
<b>Leucocitos</b>	Altos (>8.3)	6
	Bajos (<8.3)	10.4
<b>Hemoglobina</b>	Elevada (>10g/dl)	7.3
	Baja (<10g/dl)	9.6
<b>Diagnóstico</b>	Definitivo	9.8
	Posible	6
<b>Sarcomatoide</b>	Presente	5
	Otros subtipos	8.4-9.1
<b>Categorías pronósticas</b>		<b>Supervivencia (meses)</b>
<b>Bajo riesgo (score &lt;1,27, equivalente a 0-2 factores pronósticos)</b>		10.8
<b>Alto riesgo (score &gt;1,27, equivalente a tener 3 ó más factores pronósticos)</b>		5.5

**Tabla 6. Factores pronósticos del grupo CALGB**

Parámetro	Buen pronóstico	Mal pronóstico
<b>Estado funcional</b>	0-1	≥2
<b>Edad</b>	>75 años	≤75 años
<b>Recuento de plaquetas</b>	<400.000	≥400.000
<b>Dolor torácico</b>	Ausente	Presente
<b>LDH</b>	<500	≥500



---

La severidad de los síntomas se considera relacionada con la extensión de enfermedad. La disnea y el dolor torácico reflejan la extensión de la afectación pulmonar y la invasión de la pared torácica, relacionado con peor pronóstico [39,40].

El estado funcional se considera uno de los factores pronósticos más relevantes. Se incluye en las dos principales categorías pronósticas (CALGB y EORTC).

Recientemente se ha considerado otro factor hematológico, el índice neutrofilo-linfocitario (NLR) como un factor de mal pronóstico en MPM [42].

Aunque la exposición al asbesto debe considerarse más un factor de riesgo que un factor pronóstico, se ha sugerido que mayor duración de la exposición y mayor intensidad de la exposición llevan al desarrollo de tumores más agresivos [43].

Recientemente se han evaluado las técnicas de imagen como posibles factores pronósticos. El TAC de tórax está evaluando su capacidad para definir un pronóstico de acuerdo con el grueso de tumor medido por TAC [44].

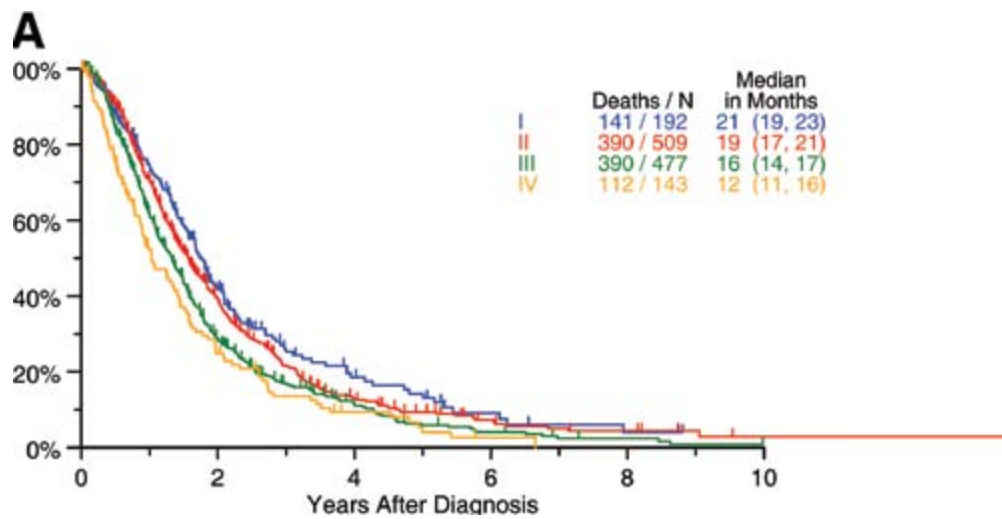
El índice de captación de glucosa (SUV) del PET ha sido investigado como factor pronóstico en MPM, sugiriendo que el SUV bajo es un factor pronóstico favorable [46].

Recientemente el grupo internacional para el estudio del cáncer de pulmón (IASLC) ha elaborado una base de datos con más de 3000 pacientes para intentar mejorar la estadificación de los pacientes con MPM frente a una próxima revisión del TNM [45]. Del análisis preliminar de este estudio destaca que existen diferencias en la supervivencia de acuerdo a la histología (19,13 y 8 meses para los epiteliales, bifásicos y sarcomatoides respectivamente), y por estadio (20,19,16 y 11 meses para estadio I,II, III y IV).

Además de los factores clínicos se han estudiado firmas génicas en MPM, pero hasta el momento la variabilidad de los genes incluidos en las distintas firmas y la falta de reproducibilidad de los resultados, hacen que en la actualidad no se utilicen las firmas génicas como factores pronósticos en MPM [47,48].

**Tabla 7. Principales biomarcadores pronósticos**

<b>Biomarcador</b>	<b>Referencia</b>	<b>Función</b>	<b>Correlación con pronóstico</b>
<b>ERCC1</b>	Zimling [48]	Reparación DNA	Favorable
<b>NF-kB</b>	Yang [49]	Estrés oxidativo	Desfavorable
<b>COX2</b>	Edwards [50]	Estrés oxidativo	Desfavorable
<b>EGF</b>	Edwards [51]	Factor de crecimiento	Desfavorable
<b>VEGF</b>	Demirag [52]	Factor de crecimiento	Desfavorable
<b>Wnt</b>	Mazieres [53]	Ciclo celular	Desfavorable
<b>Hippo</b>	Yokoyama [54]	Ciclo celular	Favorable
<b>P53</b>	Hopkins-Donaldson [55]	Ciclo celular	Desfavorable
<b>Bcl-xL</b>	Gordon [56]	Apoptosis	Desfavorable
<b>PTEN</b>	Opitz [57]	Apoptosis	Favorable
<b>Telomerasa</b>	Villa [58]	Apoptosis	Desfavorable
<b>Calretinina</b>	Kao [59]	Transportador membrana	Favorable



**Figura 12. Gráfica de supervivencia por estadios [44].**

### 1.9 Tratamiento

Hasta hace poco tiempo no existían guías de consenso para el tratamiento del MPM. Es una enfermedad difícil de tratar y las decisiones de tratamiento están basadas no sólo en la situación funcional del paciente sino en la experiencia del centro.

A pesar de los modestos avances en el tratamiento la mediana de supervivencia para estos pacientes es de aproximadamente 12 meses [61]. No hay consenso respecto al tratamiento. Los pacientes candidatos a cirugía con enfermedad limitada a un hemitórax pueden ser considerados para resección quirúrgica vía neumonectomía extrapleural (EPP) o pleurodecorticación (PD) como parte de un abordaje multimodal. La radioterapia sola es generalmente ineficaz debido al gran volumen del tumor primario y a su proximidad a estructuras mediastínicas. Sin embargo la radioterapia, particularmente la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) ha demostrado reducir las recurrencias locales después de la resección por EPP [62].

El papel de la cirugía es controvertido. Hasta hace poco tiempo se consideraba la posibilidad de EPP para los estadios precoces. Sin embargo tras la publicación reciente de los resultados de un estudio prospectivo se ha puesto en duda el papel de la cirugía radical en el MPM [63]. A pesar de los resultados de este estudio las guías recomiendan un acercamiento combinado de quimioterapia y EPP para los pacientes con tumores resecables si pueden acceder a centros con cirujanos expertos en el manejo de MPM.

La PD es un tratamiento quirúrgico que elimina la pleura parietal y visceral para conseguir una resección de todo el grueso tumoral. En un estudio con 663 pacientes se ha comparado EPP vs PD y concluyen que la mortalidad postquirúrgica es mayor en EPP que PD (7% v 4%) y que independientemente de las complicaciones, los pacientes que realizaron la EPP tenían peor supervivencia [64].

Históricamente las tasas de respuesta a la quimioterapia han sido menores del 20%. Sin embargo con la adición del antifolato pemetrexed se mejoró la tasa de respuesta hasta un 41% [65]. La combinación de quimioterapia con cisplatino y pemetrexed se ha convertido en el estándar basado en un estudio fase III que demuestra un aumento de supervivencia comparado con cisplatino sólo. En el estudio se incluyeron 456 pacientes alcanzando una mejoría en la supervivencia de 9.3 meses con el cisplatino frente a 12 meses con la combinación ( $p=0.020$ ). Igualmente el pemetrexed mejoró la supervivencia libre de progresión de 3.9 meses a 5.7 meses ( $p=0.001$ ) y en la tasa de respuesta de 17% al 41% ( $p<0.0001$ ). Para disminuir la toxicidad se ha analizado la sustitución de carboplatino por cisplatino en dos estudios fase II. Las tasas de respuesta obtenidas con carboplatino son de 19% con una mediana de tiempo a progresión de 6.5 meses y una supervivencia de 12.7 meses [66,67].

Un estudio con otro antifolato, raltitrexed, en combinación con cisplatino en 250 pacientes prolonga la supervivencia comparado con cisplatino en pacientes no previamente tratados (11.4 vs 8.8 meses,  $p=0.048$ ) [68].

La combinación de pemetrexed con cisplatino es el estándar de tratamiento, pero la mejora de supervivencia es de menos de tres meses frente al cisplatino solo. Además debido a la edad de presentación de los pacientes y a las comorbilidades de estos pacientes muchos no son elegibles para intervención terapéutica. Esto indica una necesidad urgente de mejorar los tratamientos.

**Tabla 8. Estudios de quimioterapia en pacientes MPM**

Autor	Fase	N	Quimioterapia	respuesta	SLP	SG
Vogelzang [65]	III	226	Cisplatino+ pemetrexed	41.3	5.7	12.1
Van Meerbeeck [68]	III	126	Cisplatino+ raltitrexed	23.6	-	11.4
Ceseroli [66]	II	102	Carboplatino+ emetrexed	18.6	6.5	12.7
Obasaju [69]	EAP	728	Cisplatino+ pemetrexed	21		10.8
Santoro [70]	EAP	861	Cisplatino+ pemetrexed	22		-
Hillerdal [71]	II	173	Carboplatino+ge mcitabina+adriam icina liposomal	33		13

SLP: supervivencia libre de progresión. SG: supervivencia global. EAP: programa de uso expandido

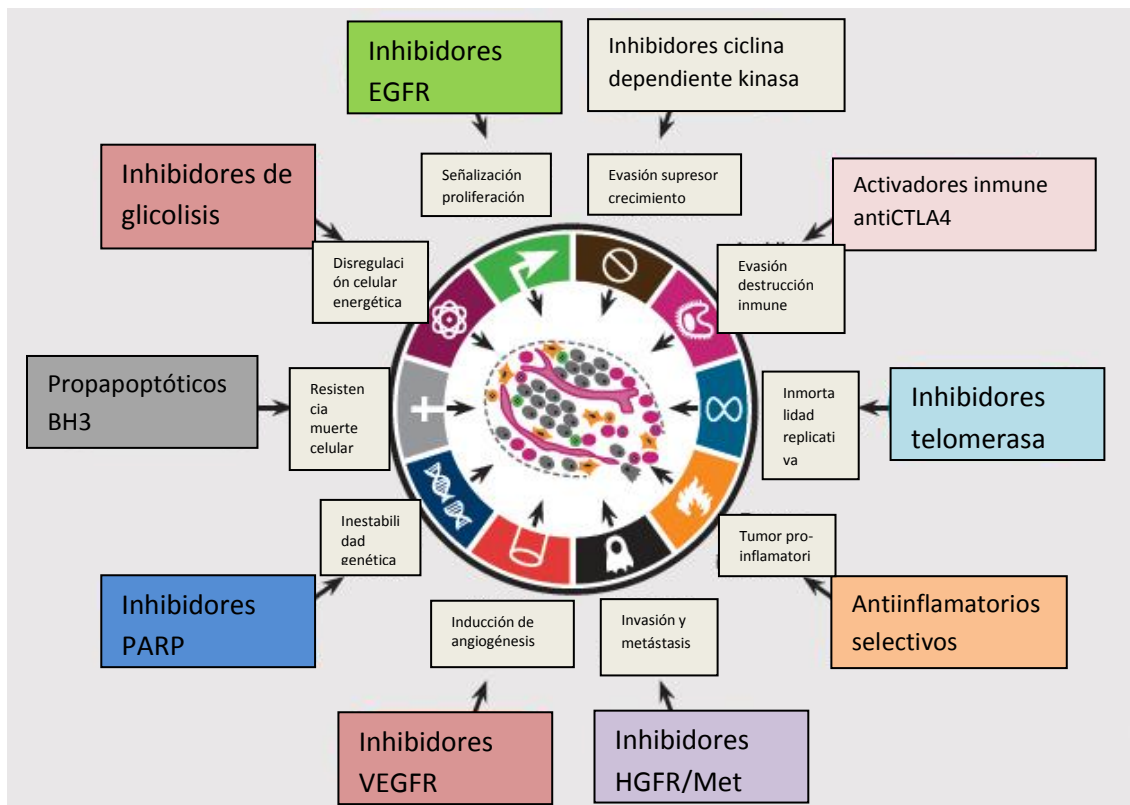
**Tabla 9. Recomendaciones del tratamiento según las guías NCCN [71].**

Estadio	Tratamiento	Comentario	Grado recomendación
<b>I-III(noN2) operable,</b>	QT induccion (cisplatino pemetrexed) seguido de cirugía	EPP en epitelioides PD en no epitelioides	2B
<b>I-III (no N2) no operable</b>	QT (cisplatino y pemetrexed)		1
<b>IIIN2 y IV</b>	QT (cisplatino y pemetrexed)		1

1: recomendación basada en alto nivel de evidencia. 2: recomendación basada en bajo nivel de evidencia

## 2. Inmunidad relacionada con el cáncer

Estudios epidemiológicos han demostrado que la inflamación crónica causada por agentes químicos y físicos, respuestas autoinmunes y reacciones inflamatorias puede predisponer a ciertos tipos de cáncer [75]. La combinación de las observaciones clínicas y de hallazgos experimentales ha llevado a considerar la inflamación relacionada con el cáncer como uno de las “características” del cáncer [76].



**Figura 13. Características del cáncer. Adaptada de Hanahan D [72].**

En el MPM la vía por la que las células mesoteliales se convierten en malignas es muy variable, dependiendo de factores ambientales y del huésped, incluyendo polimorfismos y mutaciones en genes de susceptibilidad, factores como la edad y la respuesta del sistema inmune frente a la inflamación crónica.

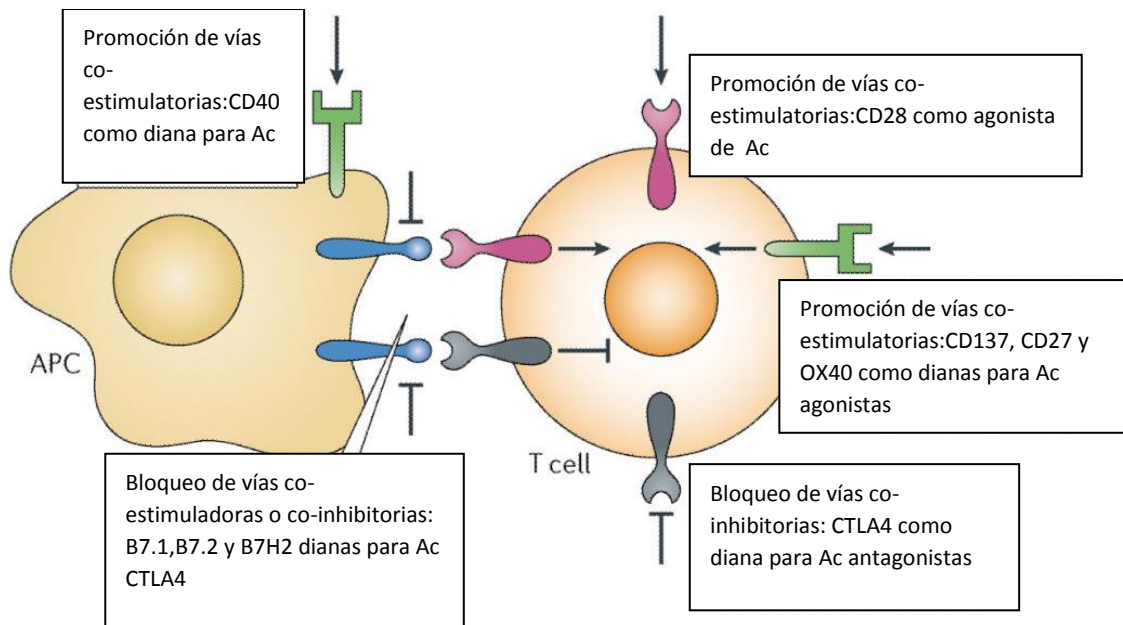
Como acercamiento general para promover respuestas inmunes específicas hacia el tumor se puede o bien aumentar la maduración de los linfocitos en los órganos linfoides o las funciones efectoras en la periferia por medio de la participación de vías co-estimuladoras. Alternativamente, la activación del sistema inmune se puede promover a través del bloqueo de pasos co-inhibitorios, como por ejemplo la vía de PD-L1 y la vía del CTLA4. La activación inmune aumentada por los receptores co-estimuladores se inicia generalmente a través de la quinasa proximal de membrana y es seguida por cascadas de

fosforilación, mientras que receptores co-inhibitorios como CTLA4 y PD1 reclutan fosfatasa para revertir la activación de los eventos inducidos por fosforilación [74].

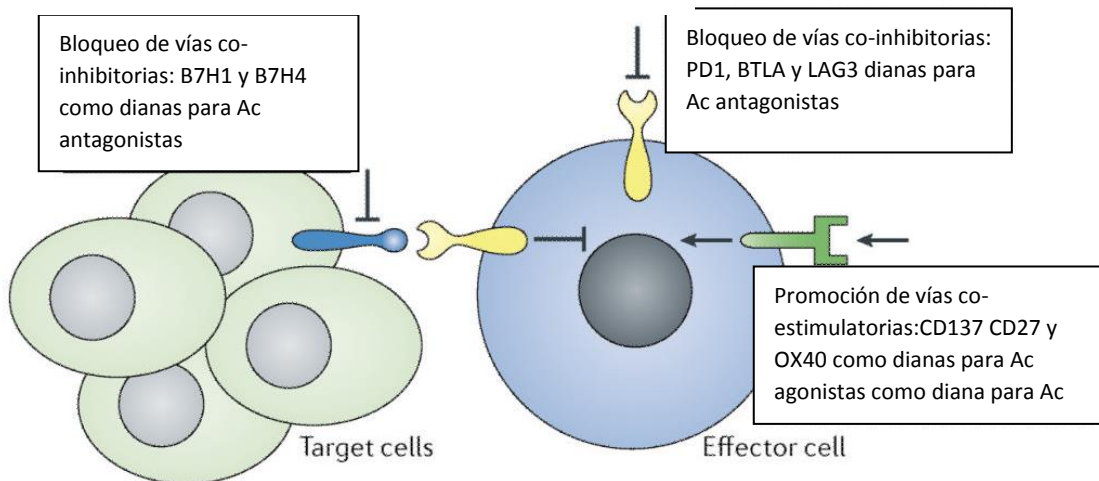
La activación de los linfocitos puede ser inhibida para suprimir la inmunidad no deseada, bloquear los receptores co-estimuladores o desencadenar una vía reguladora negativa. El primer inmunomodulador biológico aprobado en el mercado fue el muromonab en el año 1986, dirigido contra CD3 y autorizado para la prevención del rechazo al trasplante. Desde entonces se ha aprobado el inhibidor del receptor CTLA4 ipilimumab para el tratamiento del melanoma metastásico en el año 2011. Más recientemente se ha demostrado que moléculas dirigidas hacia PD-1 y PD-L1 inducen respuestas significativas y duraderas en variedad de tumores sólidos.



**a. Órganos linfoides: modulación de la fase inicial**



**b. Tejidos periféricos: modulación de la fase efectora**



**Figura 14. Modulación inmune del linfocito activado. Adaptada de Yao S [74]**

## **2.1 Sistema de inmunovigilancia tumoral**

Los antígenos asociados al tumor (TAA) son antígenos adquiridos por las células tumorales en el proceso de transformación neoplásica que pueden provocar una respuesta inmune específica por el huésped. La expresión de estos antígenos está causada por mutaciones que llevan a la síntesis y sobreexpresión de las proteínas anormales. El sistema inmune puede discriminar entre células malignas y las normales a través del reconocimiento de estos TAA. Se sabe que muchos tipos de células inmunes están envueltas en el reconocimiento y destrucción de tumores durante la etapa precoz del desarrollo. Estos incluyen células y factores del sistema inmune innato como los macrófagos, neutrófilos, componentes del complemento, células T, células killer (NK) y ciertas citoquinas (IL12, IFN $\gamma$ ) y células del sistema inmune adaptativas como linfocitos B, células T helper y linfocitos T citotóxicos (CTL).

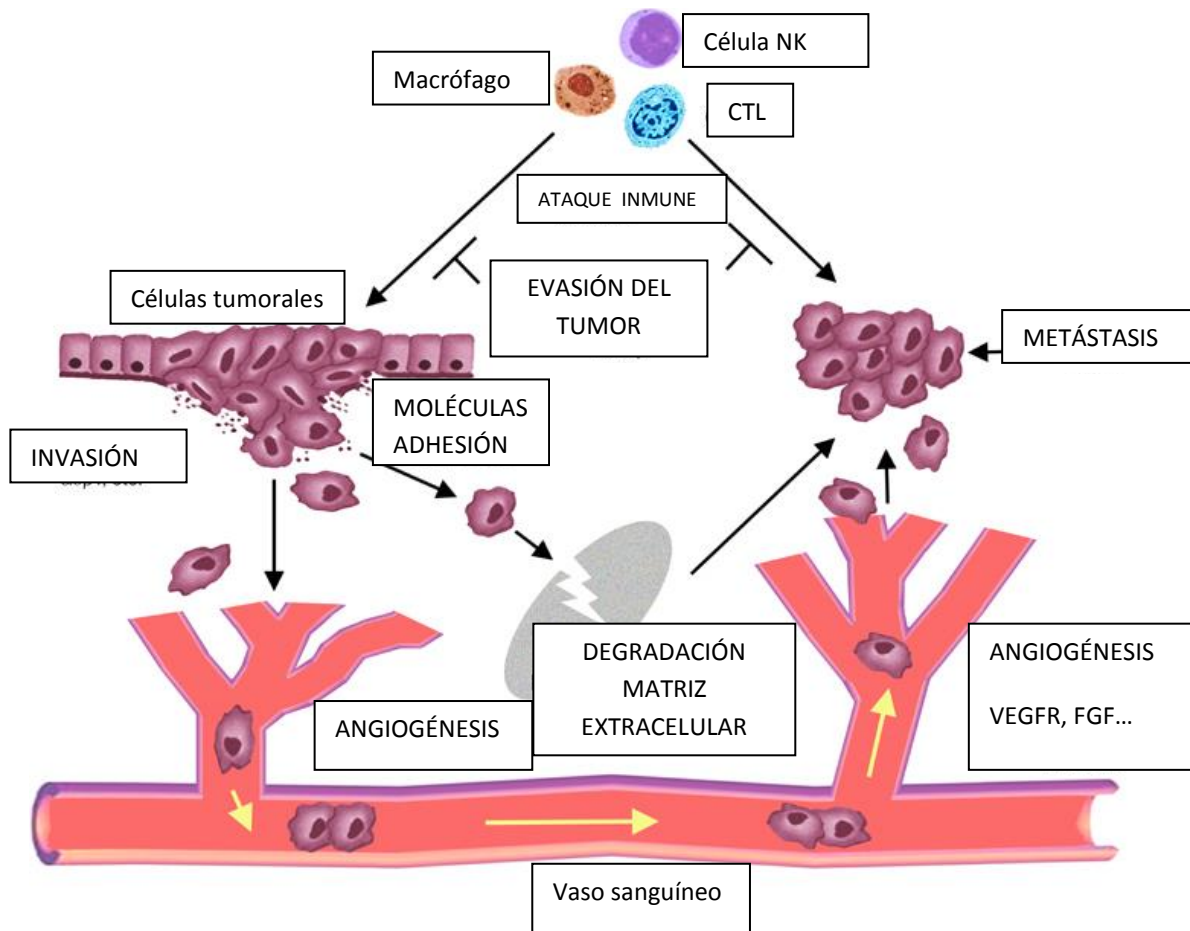
Los TAA son secretados por las células tumorales o liberados cuando estas mueren. Cuando los TAA son atrapados por las células dendríticas u otras células presentadoras de antígenos, las células maduran y migran a los órganos linfoides regionales. Los antígenos capturados son procesados y presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II en la membrana celular llevando a la activación de linfocitos antígeno específico. Esto resulta en la producción de CTL específico al tumor por parte de los linfocitos B para asistir a la respuesta inmune innata en las células tumorales.

Cuando el tumor progresa en el tiempo las células tumorales presentan cambios para escapar a la vigilancia inmune. Las células que no son eliminadas por el sistema inmune pueden entrar en un estado de equilibrio entre el crecimiento del tumor y la muerte del tumor. En esta etapa los tumores pueden persistir sin progresar y las células tumorales pueden sufrir mutaciones causadas por sus inestabilidades genéticas, generando variantes que luego escapan al sistema inmune por evasión de la inducción de una respuesta inmune o por la inhibición de las respuestas antitumor vía una variedad de mecanismos.

## **2.2 Mecanismos inmunosupresores**

La inducción por parte del tumor de un microambiente inmune supresor es una vía de escape por la cual los tumores pueden resistir la destrucción inmune. En este microambiente las células inflamatorias y otras moléculas influyen en la progresión del cáncer.

Las respuestas inmunes adaptativas son suprimidas a través de diversas vías. Por ejemplo la activación de las células dendríticas, que es clave indicador de la respuesta adaptativa inmune, es inhibida por señales presentes en el microambiente tumoral (IL10 y VEGF). Además tanto los tumores como los ganglios linfáticos contienen linfocitos T reguladores (Treg) que suprimen la respuesta inmune adaptativa e innata. En resumen, las células inmunes pueden o proteger al huésped contra el desarrollo del cáncer o promover la emergencia de tumores con reducida inmunogenicidad llevando a una compleja interacción del crecimiento tumoral y mecanismos de regresión tumoral [77].



**Figura 15. Mecanismos de evasión inmune. Adaptada de Pai S [78]**

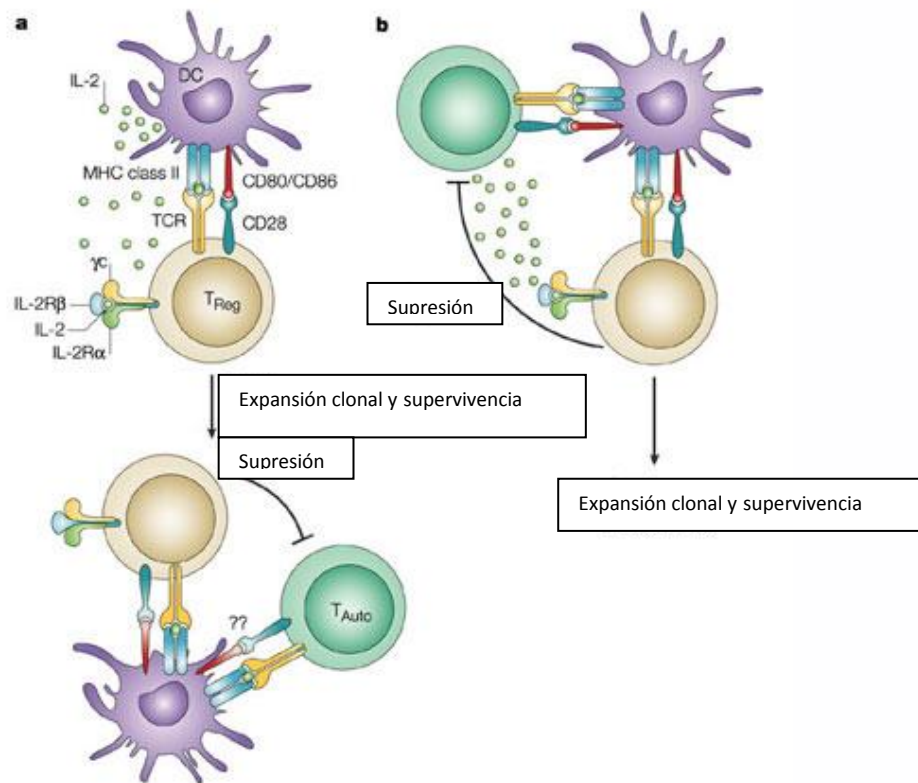
Los elementos principales de esta vía son las células supresoras derivadas mieloides (monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas) que están aumentadas en los pacientes con cáncer y juegan un papel durante la respuesta innata y adaptativa al cáncer. Las células mieloides inhiben la respuesta inmune por producir especies reactivas de oxígeno (ROS), expresión de enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) y por bloquear e inhibir la proliferación de las células T. Los macrófagos asociados al tumor (TAM) suprimen la respuesta adaptativa inmune mediante la producción de citoquinas inmunosupresoras, expresión de enzimas supresoras de la activación T y producción de proteasas que llevan a la degradación de la matriz extracelular.

### **2.3 Linfocitos T reguladores**

Son una población de células CD4+T importantes en la prevención de la autoinmunidad y la promoción de la tolerancia vía su función supresora en las células dianas [79]. La característica de los linfocitos T reguladores (Tregs) es la expresión de CD25, factor de transcripción forkhead/winged-helix (Foxp3), el gen 3 de activación de linfocito (LAG-3) y el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4) [80].

Los Tregs son importantes en el mantenimiento de la tolerancia periférica frente a los autoantígenos previniendo la autoinmunidad. Representan el 5% del total de los CD4+T [81]. Los Tregs fueron identificados en los linfocitos infiltrantes de los tumores en humanos y la prevalencia de Tregs en los linfocitos infiltrantes del tumor es mucho mayor que su proporción en la sangre periférica constituyendo el 20% o más de los linfocitos que infiltran el tumor [82].

Un aumento de los Tregs ha sido identificado en sangre de los pacientes con cáncer comparado con individuos normales y su presencia predice peor supervivencia [83]. En los pacientes con MPM se ha identificado un aumento de los Tregs en el líquido pleural, con una clara variabilidad entre pacientes [84].



**Figura 16. Diagrama de activación del linfocito T regulador. Adpatada de Malek T [85]**

## **2.4 Linfocitos T infiltrantes (TIL)**

Los tumores malignos contienen un número variable de linfocitos que se conocen como linfocitos infiltrantes del tumor (TILs). Los antígenos que reconocen las células T están compuestos por péptidos y proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los CD4 helper (TH) reconocen antígenos presentados la clase II del MHC, mientras que los CD8 citotóxicos (CTL) reconocen péptidos presentados por antígenos del MHC clase I. El MHC clase I se expresa en todas las células nucleadas y tiene una amplia distribución, incluyendo células tumorales. Se sospecha que tienen un valor en la mediación de la destrucción citotóxica de las células transformadas [86].

En contraste la expresión de antígenos del MHC tipo II está normalmente limitada a las células presentadoras de antígenos “profesionales”, pero estos antígenos pueden estar expresados aberrantemente en las células tumorales como resultado de la inflamación peritumoral [87].

Estudios in vitro han demostrado que la composición de las células T dentro del microambiente tumoral varía en los pacientes, oscilando desde un infiltrado con 90% de células CD4+ hasta un infiltrado con 90% de CD8+ [88-90].

El análisis del microambiente del tumor evidencia que la mayoría de tumores presentan un fenotipo de linfocitos T que infiltran al tumor. En el cáncer de colon en estadios precoces la presencia de linfocitos CD8+ activados, tanto dentro del tumor como en el estroma peritumoral, es un factor pronóstico significativo [91,92]. Los mismos resultados se han demostrado en cáncer de mama, renal, melanoma, cáncer de ovario y tumores del estroma gastrointestinal [93-97]. Se ha propuesto que un componente de este infiltrado inflamatorio incluye células T que han sido activadas espontáneamente en respuesta al crecimiento del tumor, y quizás a través de mecanismos de vigilancia inmunológica [98]. Hay que considerar también que la acumulación de células T en el microambiente del tumor podría ser un fenómeno secundario reflejando la activación de vías oncogénicas diferentes [99,100].

Otra hipótesis que podría explicar la presencia de células T en el microambiente tumoral en un grupo de tumores es la generación de estructuras linfoides terciarias (TLS). Muchos tumores parecen tener una organización arquitectónica que incluye la segregación de células B y T y la presencia de una estructura vascular endotelial. Los tumores con células T infiltradas expresan quimoquinas que podrían mediar el reclutamiento de efectores CD8 [101].

## **2.5 Superfamilia de moléculas co-señalizadoras**

Las respuestas de los linfocitos T antígeno específicas son controladas positiva y negativamente por moléculas co-estimuladoras y co-inhibitorias [74]. Las moléculas co-inhibitorias previenen la inmunidad dirigida inapropiadamente y limitan el tamaño y la duración de las respuestas inmunes. Entre estas moléculas inhibitorias, conocidas globalmente como moléculas co-señalizadoras, están el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) que controla las etapas iniciales de la activación del linfocito T y muerte programada 1 (PD1) [102].

Aunque la respuesta inmune endógena al cáncer se observa en modelos preclínicos y en pacientes, esta respuesta es ineficaz, porque los tumores desarrollan múltiples mecanismos de resistencia, incluyendo la supresión inmune, la inducción de tolerancia y la disfunción sistémica en la señalización de la célula T. Además los tumores pueden explorar distintas vías para activamente evadir la destrucción inmune, incluyendo los co-señalizadores que normalmente terminan la respuesta inmune después de la activación de antígenos. PD1 es un receptor inmune co-señalizador expresado por las células T activadas y que media inmunosupresión. PD1 funciona principalmente en tejidos periféricos donde las células T pueden encontrar los ligandos inmunosupresores de PD1 (PD-L1 y PD-L2) los cuales están expresados por las células tumorales, células estromales o ambos.



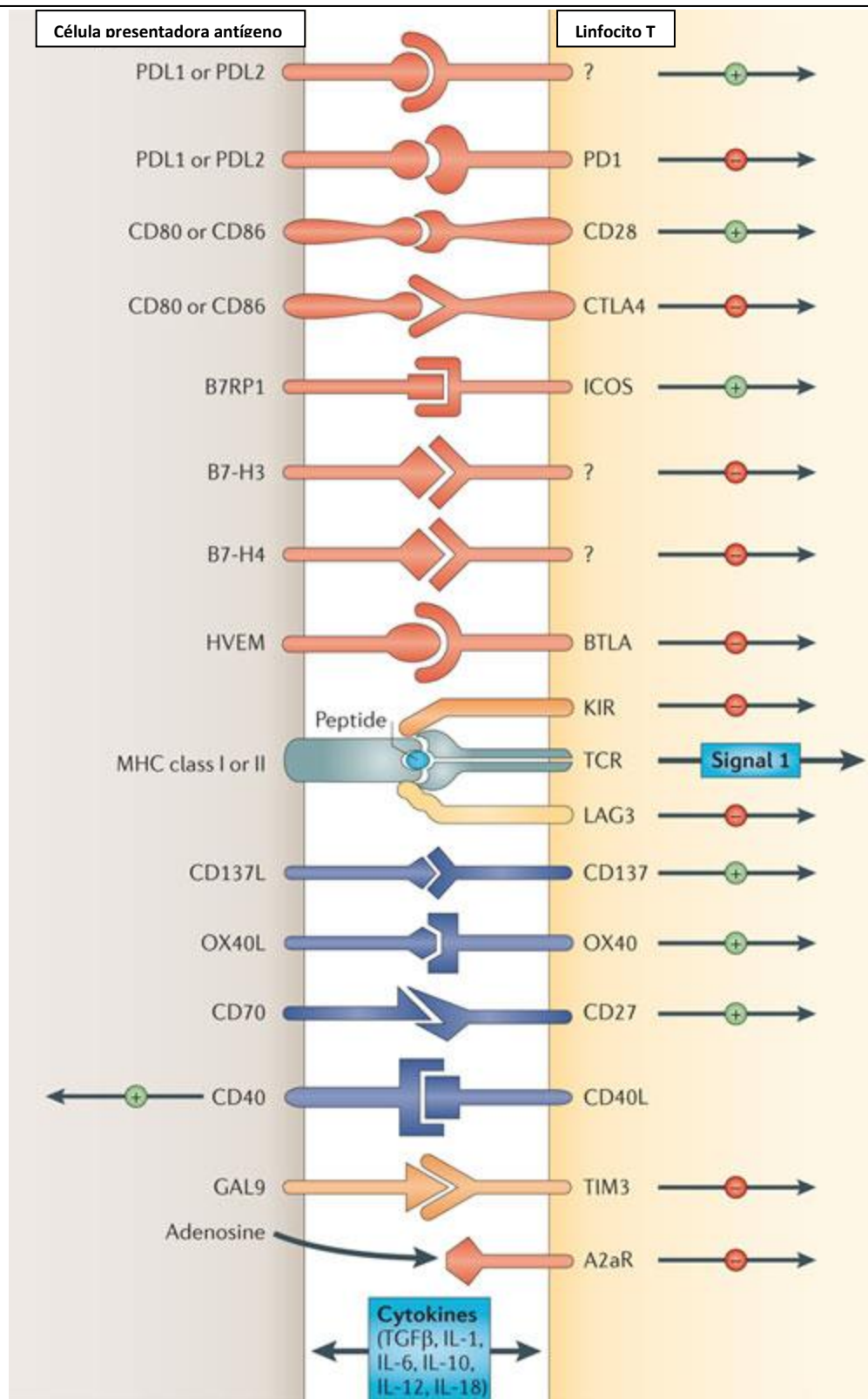


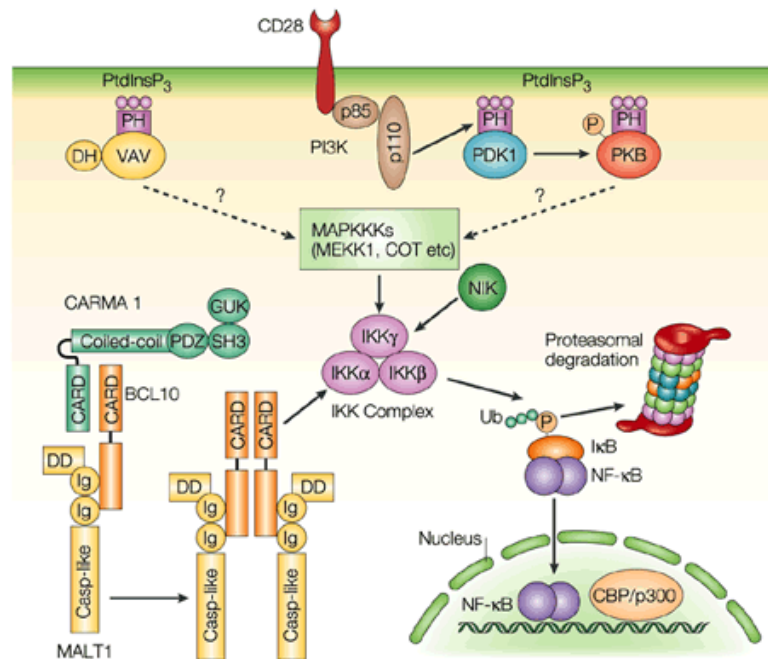
Figura 17. Imagen de señales co-estimuladoras e inhibitorias del linfocito T. Adaptada de Pardoll D [103]

La primera superfamilia de moléculas co-señaladoras identificada fue la del ligando y el receptor B7-CD28 en el año 1990. Los miembros de la familia del receptor CD28 tienen una región Ig variable (IgV) en su dominio extracelular e incluyen los CD28, CTLA4, ICOS, PD1 y BTLA9. Sus ligandos conocidos pertenecen a la familia de ligandos B7, que tienen una estructura típica de dos dominios extracelulares, una región IgV y una IgG constante (IgC). Bajo ciertas circunstancias algunos de estos receptores pueden servir como ligandos y viceversa.

### 2.5.1 Eje del CD28-CTLA4-ICOS

Constitutivamente expresado en los linfocitos T nativos, el receptor CD28 proporciona la primera señal co-estimuladora para activar al linfocito T nativo después de la unión de B7.1 o B7.2, los ligandos de CD28 que se expresan principalmente en las células presentadoras de antígenos (APC) [74].

CD28 activa PI3K y la cascada de MAPK y como resultado inducen la expresión de IL-2 y citoquinas efectoras pro y antiinflamatorias que promueven la activación de las células T, diferenciación y transformación en linfocitos T memoria. CTLA4, un CD28 homólogo inducido en las células T activadas sirve como co-inhibidor para mantener las respuestas T bajo control después de la unión de B7.1 y/oB7.2. El efecto negativo esencial de CTLA4 en controlar la activación de las células T fue demostrado en ratones CTLA4 deficientes que presentaban fallo multiórgano fatal causado por una proliferación e infiltración linfocitaria incontrolada.



**Figura 18. Cascada de señalización del receptor CD28. Adaptada de Rudd C [104]**

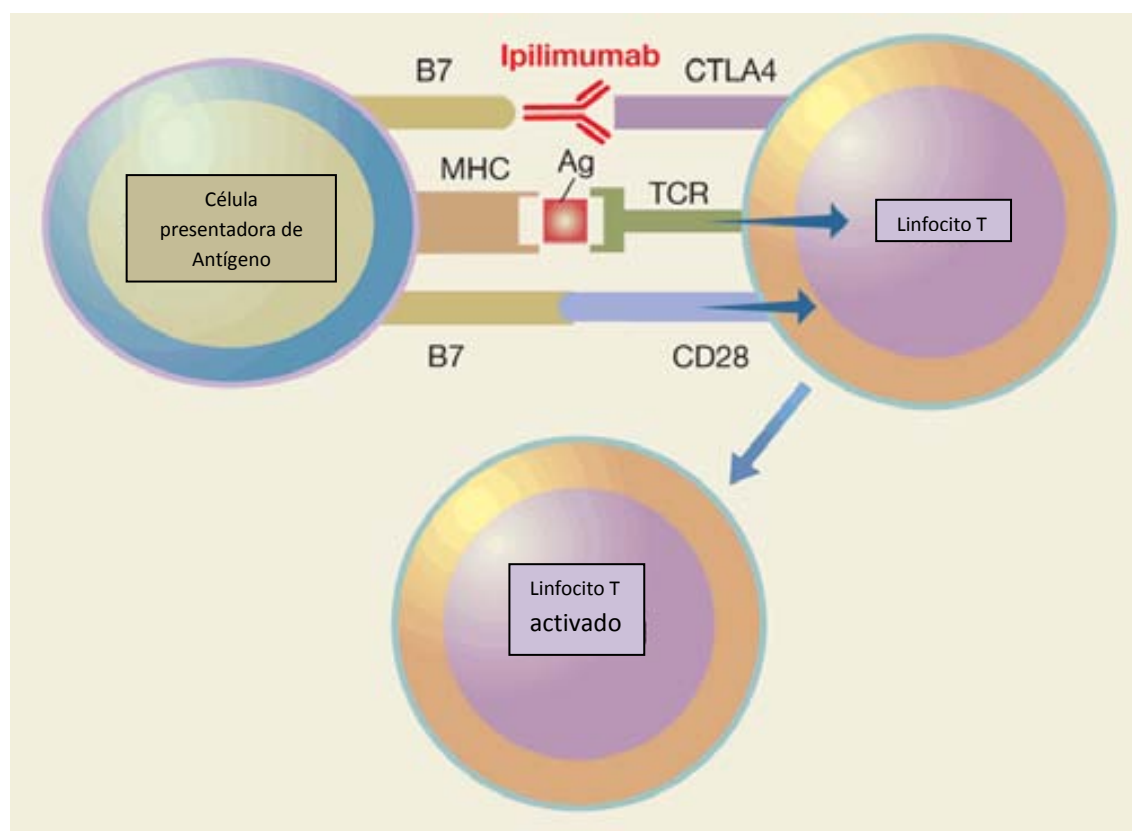
ICOS, otro homólogo de CD28, es inducido en las células T activadas y está constitutivamente expresado en el linfocito T helper folicular. Promueve la activación de las células T y células B mediante la interacción con el ligando B7H2.

En humanos la expresión de B7.1 y B7.2 está ampliamente restringida a las células presentadoras de antígenos (APC), mientras que B7H2 se expresa por las APC y también por las células del parénquima, incluyendo células endoteliales y epiteliales, bajo condiciones inflamatorias.

Los agonistas biológicos que se dirigen hacia CD28 o ICOS aumentan las células T antígeno específicas y la respuesta inmune antitumor. Fármacos agonistas de B7.1 y B7.2 han demostrado producir regresión tumoral en modelos murinos. En lugar de promover señales co-estimuladoras, el bloqueo de la vía

co-inhibitoria CTLA4 ha demostrado eficacia en el tratamiento del cáncer. La infusión de anticuerpos que bloquean CTLA4 resulta en una activación inmune sostenida y en la inducción de una potente respuesta antitumoral con limitada autoinmunidad en modelos de ratones.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar los efectos antitumor, por un lado el bloqueo de CTLA4 previene la unión con ligandos B7 a los linfocitos activados que expresan CTLA4, permitiendo la activación persistente a través de CD28, y por otro lado el bloqueo de CTLA4 inhibe los linfocitos T reguladores inmunosupresores CD4+CD25+, linfocitos T reguladores que expresan constitutivamente altos niveles de CTLA4. Ipilimumab, una IgG1 humanizada anti CTLA4 ha sido aprobada para el tratamiento del melanoma e induce respuestas en 10-15% los pacientes y prolonga de manera significativa la supervivencia.



**Figura 19. Mecanismo de acción del ipilimumab. Adaptada de Garber K [105]**

### 2.5.2 Vía B7H1(PD-L1), B7DC y PD1

B7H1(PD-L1) y su homólogo B7DC (también conocido como PD-L2) se identificaron en el año 1999 como nuevos miembros de la familia de B7 [74].

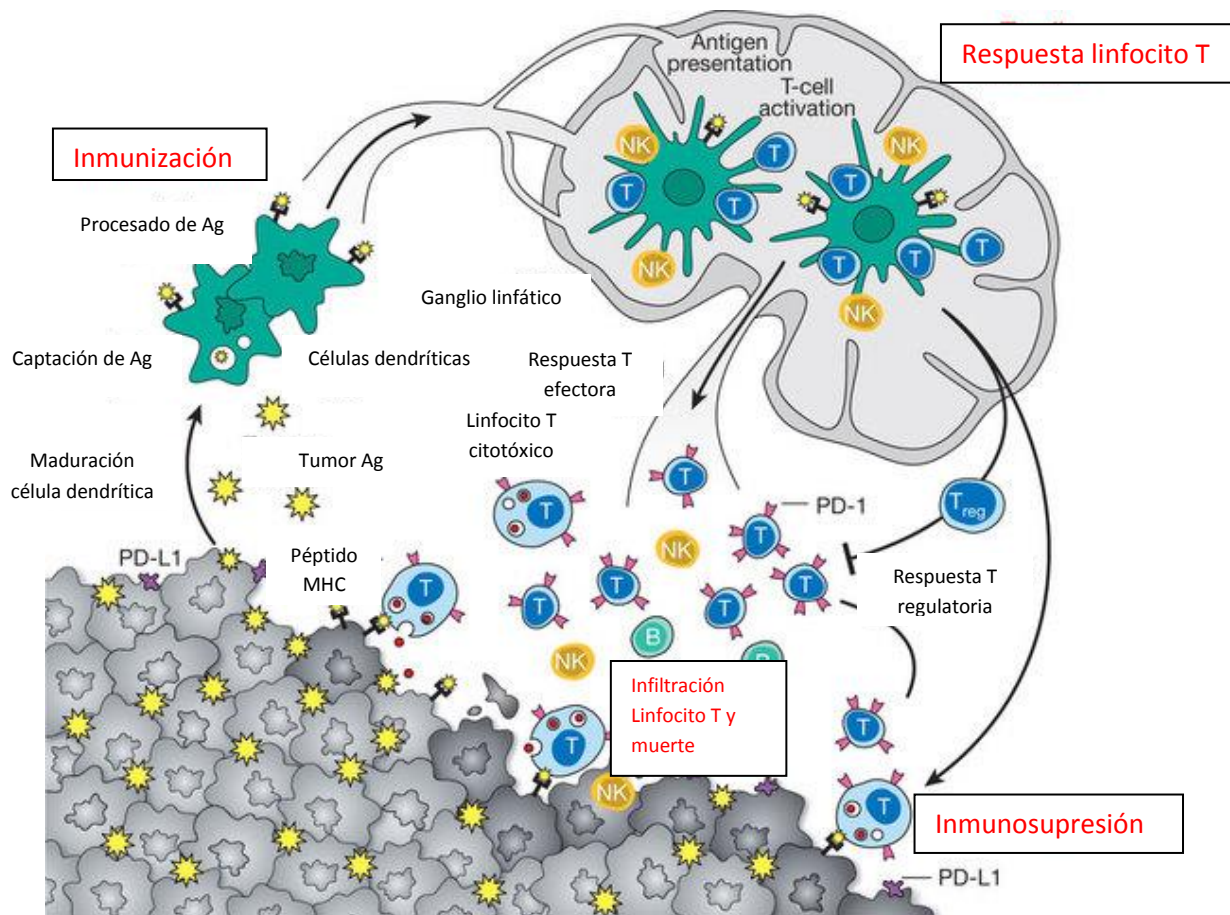
PD1, un homólogo de CD28 y CTLA4 está implicado en promover la muerte celular, controlar la activación de los linfocitos y el daño tisular durante la respuesta inmune y mantener la tolerancia periférica [106-108]. PD-L1 es una proteína de superficie celular que se expresa constitutivamente en las APC (macrófagos y células dendríticas) o de forma inducida en algunos tipos celulares en respuesta a las citoquinas proinflamatorias. Su expresión es inducible en gran variedad de tejidos y tipos celulares incluyendo células epiteliales y endoteliales, linfocitos T activados, células B, macrófagos, células dendríticas y monocitos, pero no se expresa en sus formas nativas. La expresión de B7DC está restringida principalmente a las células dendríticas y macrófagos.

PD1 es especialmente importante en la tolerancia periférica de autoantígenos. PD1 es un regulador negativo de los linfocitos T y actúa como un receptor co-inhibitorio para prevenir la activación inmune. Se une a dos receptores que son PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) que se encuentran en las células tumorales [109].

En el huésped sano la vía de PD1 en el linfocito T regula la respuesta inmune para minimizar el daño al tejido y prevenir el desarrollo de autoinmunidad mediante la promoción de la tolerancia de autoantígenos. La unión de PD1 al ligando PD-L1 en los macrófagos u otras células presentadoras de antígenos, o al endotelio, inhibe la producción de numerosas citoquinas y promueve la apoptosis de las células T vía la inhibición del factor de supervivencia Bcl-cl [110]. La unión de PD1 con PD-L1 causa inhibición de la producción de IL-2 y activación de la célula T.

En los tejidos periféricos la unión de PD-1 con PD-L1 inhibe la proliferación de las células T activadas llevando a que el linfocito T quede exhausto, que consiste en una condición hiporeactiva.

La sobrerregulación de PD1 en estas células inhibe las respuestas inmune innata y adaptativa. Se ha observado que los ratones PD1 deficiente tienen varios tipos de enfermedades autoinmunes como el desarrollo temprano de artritis, lupus y diabetes. Su expresión en tumores sólidos puede inhibir la producción de citoquinas y la actividad citolítica de PD1 y los linfocitos T infiltrantes CD4+ y CD8+. Se ha demostrado que revierte la señalización a través de PD-L1 en las células dendríticas y regula la producción de citoquinas e inhibe la maduración de las células dendríticas y la supervivencia de las células T activadas [110,111].



**Figura 19. Mecanismo de acción de la vía PD1-PD-L1. Adaptada de Mellman I [112]**

Aunque es razonable asumir que bloquear la vía del PD-1 reactiva la expresión de linfocitos que infiltran el tumor (TIL) en las células PD-L1, estudios in vitro en infecciones crónicas virales sugieren que la población de las células T que expresan altos niveles de PD-1 están “exhaustas” y pueden no ser reactivadas sólo por el bloqueo de PD-1 [113]. Estos linfocitos T exhaustos que resultan de la exposición crónica de antígenos (causada por la infección viral persistente o por tumores) , expresan altos niveles de moléculas co-inhibitorias, tienen pobre funcionalidad efectora y un distinto patrón transcripcional y pueden realmente constituir un discreto estadio de diferenciación de la célula T.

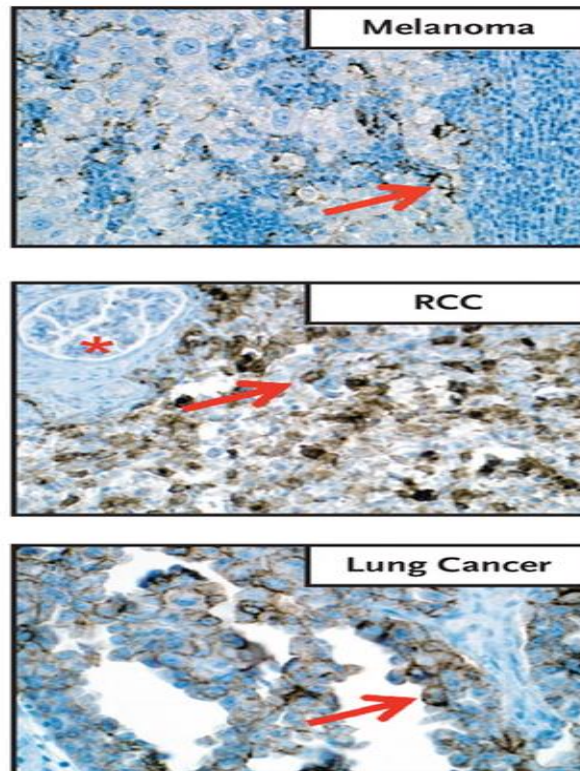
Los tumores parecen utilizar mecanismos que suprimen y facilitan la evasión del huésped, como promover la anergia de las células T, el estado del linfocito T exhausto, ausencia de respuesta y apoptosis, inducción de la expansión de las células Treg y también aumentando la resistencia intrínseca del tumor a la muerte. La expresión de B7.1 en el linfocito T regulador y su interacción con PD-L1, expresado en las células APC, juega un papel crucial en la expansión del linfocito Treg durante la respuesta inflamatoria en modelos animales. La presencia de dos ligandos para PD1 (PD-L1 y B7DC) y dos receptores inhibitorios para PD-L1 (PD1 y B7.1) sugiere que los fármacos que se dirigen a PD1 o PD-L1 tienen efectos diferentes. Se especula que un anticuerpo específico que bloquee PD1 podría bloquear la vía de PD1 pero deja libre las interacciones B7.1-PD-L1, mientras que bloquear PD-L1 podría interrumpir ambas vías de PD-L1-PD1 y B7.1-PD-L1 sin interferir con la interacción B7DC-PD1. Por tanto la eliminación completa de las vías inhibitorias PD-L1 y PD1 requiere una estrategia de combinación con ambas moléculas.

Se ha reportado que PD-L1 se expresa en numerosos tumores de diferentes orígenes, incluyendo carcinoma de esófago, riñón, pulmón y cerebral. Su expresión se ha relacionado con mejor y peor pronóstico en ciertos tipos de tumores. Todos los datos de asociación de PD-L1 con pronóstico derivan de estudios retrospectivos [114-116]. Aunque existen razones biológicas para explicar estas discrepancias respecto al valor pronóstico de PD-L1, las



revisiones de la literatura que correlacionan su expresión con pronóstico deberían interpretarse con precaución por la heterogeneidad de la expresión dentro del tumor, el requerimiento de medir la proteína en membrana más que la proteína intracelular o mRNA, la ausencia de especificidad de los anticuerpos comercializados y la dificultad en los métodos de detección de PD-L1 en parafina.

La mayoría de estudios se han conducido en tejido congelado por la ausencia de un anticuerpo apropiado antiPD-L1 que pueda teñir PD-L1 en muestras de parafina.



**Figura 20. Imagen de ejemplos de tinción positiva PD-L1 en melanoma, cáncer renal y cáncer de pulmón. Adaptada de Topalian S [117].**

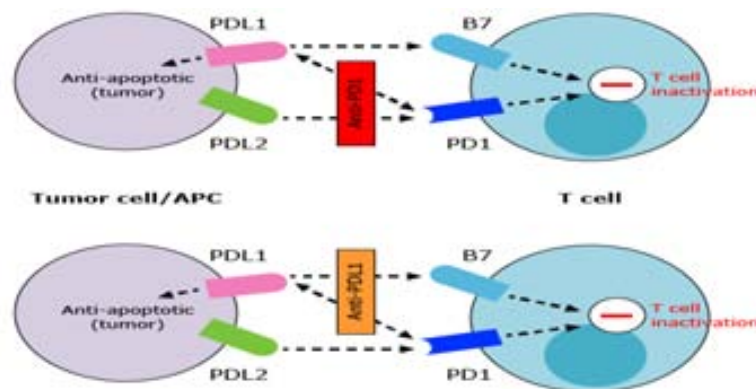


### 2.5.3 Anticuerpos hacia la vía de PD1-PD-L1

La inmunoterapia del cáncer ha supuesto una nueva y excitante opción de tratamiento desde el descubrimiento de los inhibidores de receptores co-señalizadores como CTLA-4 y más recientemente PD1 y su ligando PD-L1. El paradigma consiste en activar el sistema inmune o volver a despertar las respuestas inmunes silenciadas mediante “inhibir los inhibidores” que son responsables de paralizar las células T y crear un estado de tolerancia inmune.

El bloqueo de la vía PD-L1- PD-1 parece ser distinto del bloqueo de CTLA4, ya que los primeros funcionan mejorando el efector de las células T en el microambiente del tumor mientras ocurre la interacción. Por el contrario, los anticuerpos específicos anti CTLA4 pueden funcionar por inhibir las células T nativas en los órganos linfoides mientras tiene lugar la interacción con CTLA4.

Estudios en humanos evaluando la activación de las células CD4 y CD8 demuestran que la adición de un anti PD-L1 o un antiPD-1 aumentan la expansión y proliferación de las células T, aumentan la producción de citoquinas y la actividad citolítica del linfocito [118-121]. Estos datos apoyan el desarrollo clínico de anticuerpos que bloquean PD-1 o PD-L1.



**Figura 21. Mecanismos de bloqueo de PD1 y PD-L1. Adaptada de Topalian S [117].**

Al menos 7 terapias biológicas hacia la vía de PD-L1-B7DC- PD-1 están en investigación y algunas con resultados prometedores. Tres anticuerpos son dirigidos contra PD-1 (BMS-936558/MDX-1106, CT-011 y MK3475) y tres anticuerpos son anti PD-L1 (BMS936559/MDX-1105, MPDL380A y MEDI4736) y otro anticuerpo dirigido hacia B7DC-IgRFP.

Nivolumab (BMS936558) es un anticuerpo humanizado IgG4 que se une a PD-1 con alta afinidad y bloquea su interacción con PD-L1 y PD-L2. En un estudio fase I con 304 pacientes nivolumab se administró a dosis de 0.1 a 10 mg/kg cada dos semanas. Se incluyeron cohortes de expansión de pacientes con carcinoma renal, melanoma y carcinoma no microcítico de pulmón, próstata y colon. Encontraron respuestas objetivas en el 31% de los pacientes con melanoma, 16% de los pacientes con cáncer de pulmón y 29% de los pacientes con cáncer renal previamente tratados. En la mayoría de casos las respuestas han sido duraderas. El fármaco fue bien tolerado a todos los niveles de dosis. Los eventos adversos relacionados con la inmunidad incluyeron colitis, hipotiroidismo y artropatías poliarticulares, pero en general fueron menos que lo observado con ipilimumab, un anticuerpo específico hacia CTLA4. En un subgrupo de 42 pacientes en los que se disponía de material en parafina se midió la expresión de PD-L1 usando el anticuerpo 5H1 y se observó que ningún paciente con PD-L1 negativo en el tumor tenía respuesta mientras que un 36% de los pacientes PD-L1 positivos (definido como 5% de expresión de membrana), tenían respuesta objetiva [117]. Sugieren el uso de este biomarcador para seleccionar a los pacientes.

El MK3475 es otro anticuerpo que se está estudiando como inmunoterapia en tumores sólidos. Es una IgG4 humanizada con alta afinidad para PD-1 con buena tolerancia en las dosis de 1 a 10 mg/kg cada 2 semanas [122]. Este fármaco está siendo evaluado por la FDA para el tratamiento del melanoma en base a un estudio con 135 pacientes con melanoma avanzado en el que se observaron tasas de respuesta del 37% [123]. El tratamiento en general fue bien tolerado y sólo un 13% de los casos presentaron toxicidad grado 3-4. Los

resultados preliminares de un estudio fase I con una cohorte de expansión de pacientes con cáncer de pulmón fueron presentados en el congreso mundial de cáncer de pulmón en el año 2013 [124]. El fármaco se administró intravenoso cada tres semanas y de los 38 pacientes con cáncer de pulmón previamente tratados se obtienen respuestas parciales en 21% de los casos con una supervivencia global de 51 semanas. En el estudio observaron que la expresión de PD-L1 se relacionó con respuestas. De los 9 pacientes con resultado PD-L1 positivo, 6 alcanzaron respuesta parcial y de los 24 pacientes con PD-L1 negativo sólo uno alcanzó respuesta. Basado en estos resultados en la actualidad hay en marcha estudios randomizados evaluando el papel de MK3475 frente a quimioterapia en pacientes con expresión positiva de PD-L1.

El otro anti PD-1 es el CT-011 que es una IgG1 humanizada que aumenta la función de las células NK y los linfocitos T in vitro. El desarrollo de esta molécula se ha centrado principalmente en tumores hematológicos y en combinación con otras quimioterapias [125].

En el caso de fármacos anti PD-L1 el primer estudio fase I, BMS936559, evaluó una IgG4 humanizada que bloquea la unión PD-L1 a PD-1 y CD80. Se estudiaron dosis de 0.3 a 10 mg/kg cada dos semanas. De los 207 pacientes incluidos encuentran respuesta en 17% de los pacientes con melanoma, 12% de los pacientes con cáncer de colon, 10% de los pacientes con cáncer de pulmón y 6% de los casos con cáncer de ovario. Este bloqueo produjo también respuestas duraderas. BMS-936559 mostró un similar perfil de seguridad y con un ligero menor grado de toxicidades grados 3-4 que los inhibidores de PD1.

Porque el PD-L1 es un ligando inhibitorio para PD1 in vivo, la discreta menor eficacia de anticuerpos hacia PD-L1 en comparación con los anti PD-1 es inesperada. De todas formas, la comparación directa de ambos anticuerpos es difícil porque el efecto de un anticuerpo bloqueador está también determinado por su afinidad o avidéz, farmacocinética y estabilidad.

Otro inhibidor de PD-L1 es el MPDL3280A/RG7446. Los resultados preliminares de actividad del fármaco fueron presentados en el congreso americano de oncología del año 2013. El fármaco fue bien tolerado. En la cohorte de pacientes con cáncer de pulmón de los 53 pacientes analizados 23% alcanzaron respuesta. Del análisis de PD-L1 en las muestras tumorales de 46 pacientes, alcanzaron respuesta parcial 5 de 6 pacientes con resultado de fuerte expresión en la tinción y 6 de 13 pacientes con tinción moderada. Basados en estos datos se está evaluando el fármaco en pacientes con cáncer de pulmón PD-L1 positivos tratados o no previamente [126].

**Tabla 10. Inhibidores de PD1-PD-L1**

Diana	Agente	Molécula	Desarrollo
<b>PD1</b>	Nivolumab	IgG4	Fases II y III tumores sólidos
	Pidilizumab	IgG4	Fase II varios tumores
	MK3475	IgG4	Fase I-II
<b>PD-L1</b>	BMS936559	IgG4	Fase I
	Med14736	IgG4	Fase I
	MPDL-380A	IgG1	Fase I-II

Los datos actuales indican que la expresión de PD-L1 puede ser un biomarcador predictivo para seleccionar pacientes para tratamiento con anti PD-L1/ PD-1. La definición de positividad de PD-L1 puede estar confundida por la heterogeneidad del tumor, variabilidad en las técnicas de tinción, localización de la expresión intratumoral y la definición del punto de corte entre positivo y negativo.

Aunque los resultados con estos fármacos son prometedores, no todos los pacientes se benefician de los anticuerpos que inhiben PD-1 o PD-L1, llevando a explorar estrategias alternativas para inhibir las interacciones PDL1-PD1. Un grupo de autores, basados en la evidencia previa de que PD-L1 también inhibe CD80, formuló la hipótesis que la co-expresión de CD80 en las células tumorales PD-L1 positivas podría prevenir la inmunosupresión mediada por PD-L1-PD1 en un modelo in vitro. Concluyeron que CD80 revierte la inmunosupresión mediada por PD-L1-PD1 en ratones con tumores PD-L1 positivo y resulta en la activación del linfocito T CD4 y CD8. Sugieren que CD80 puede ser más efectivo que los anticuerpos por el mecanismo dual de inhibir las interacciones PD-L1-PD1 [127].

## **2.6 Relevancia de la inmunidad en MPM**

Recientemente la evasión inmune se ha incluido como una de las características del cáncer. Esta evasión inmune puede surgir debido a la presión inmunológica que lleva al tumor inmunosensible hacia una transición inmunoresistente.

Numerosos estudios han demostrado que el mesotelioma es un tumor inmunogénico, que induce reconocimiento inmune, infiltración de células inmunes y muerte mediada por inmunidad. Además varios casos reportados en la literatura han documentado regresiones espontáneas en pacientes con MPM con una posible base inmunológica [128-131].

Se ha estudiado el valor pronóstico de parámetros del sistema inmune en el MPM. Se ha demostrado que la infiltración de las células T mejora la supervivencia [132]. Posteriormente se identificó que una alta proporción de linfocitos CD8+ que infiltran el tumor se correlaciona significativamente con un aumento de apoptosis de las células tumorales y con mejor supervivencia que los pacientes con baja frecuencia de CD8+. Por el contrario se ha demostrado que el aumento de los linfocitos CD4+CD25+ son un factor pronóstico negativo [133]. Otros autores han demostrado una correlación de peor supervivencia en los pacientes con MPM epiteliode con altos niveles de

linfocitos CD8+ y CD3+ infiltrantes y aumento de células mieloides [134,135]

Las células de MPM liberan citoquinas y quimoquinas que causan la acumulación de células inmunoregulatorias en el tumor. Los linfocitos Treg pueden inhibir las células CD4+ y CD8+ por liberación de factores solubles inmunosupresores como IL10 y TGFB. Existen resultados conflictivos del papel de Treg y la supervivencia en MPM. Dos estudios demostraron que altos niveles de linfocitos CD4+CD25+ se asociaban con peor supervivencia, pero otros estudios han demostrado que los Treg no median inmunosupresión en un modelo de MPM y que no se observa un aumento significativo de Treg en MPM [133,136-138].

Las células mesoteliales normales y malignas también pueden producir citoquinas que son quimotácticas para los monocitos y una vez los monocitos infiltran el tumor pueden diferenciarse en macrófagos asociados al tumor (TAM) que son polarizados hacia el fenotipo supresor M2 [139,140].

Las células del MPM segregan TGFB, un promotor tumoral, estimulante de la angiogénesis y poderoso inmunosupresor local y sistémico [141]. También se ha observado que los MPM producen VEGF y altos niveles de este factor se han asociado con resistencia a la inmunoterapia con IL-2.

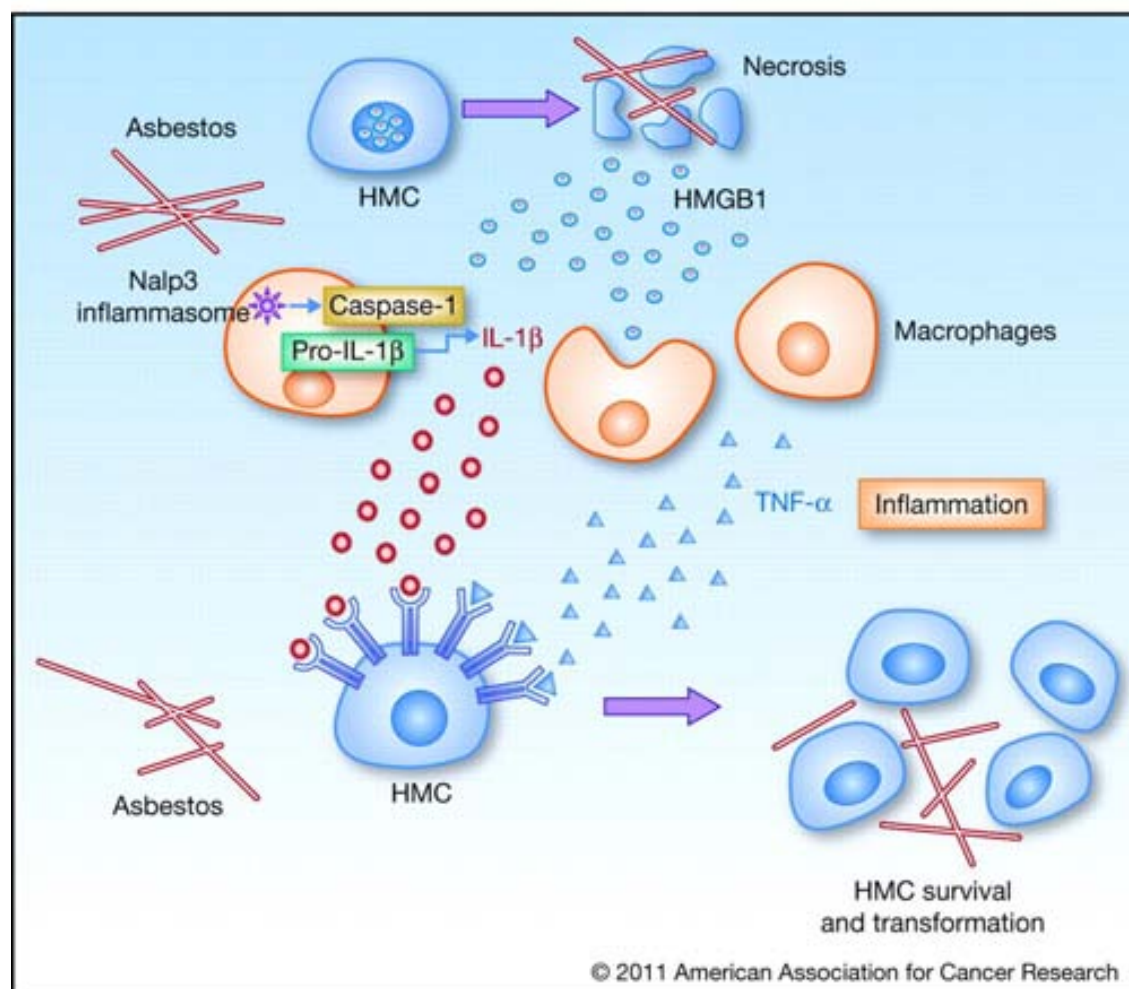
En MPM se ha demostrado que la proteína merlin tiene implicaciones en la regulación de p53, llevando a la resistencia de las señales apoptóticas [142]. Además se han observado frecuentes defectos de moléculas co-señalizadoras del ciclo celular en MPM, así como una consistente sobreexpresión de la quinasa 1 que sirve como un mecanismo de resistencia a CTL [143,144]. Otros mecanismos que impactan en la sensibilidad de las CTL en el MPM son la sobreexpresión de proteínas de la familia bcl2, activación anómala de la vía de Raf/MEK/ERK y de la vía de PI3K/AKT [145,146].

Se ha observado en modelos in vitro que PD-L1 también se expresa en MPM y regula negativamente la actividad de los linfocitos T [147,148].

### 2.6.1 Elementos inmunológicos del MPM

En base a la observación de que algunos pacientes con MPM pueden tener respuesta inmune con regresiones espontáneas, se considera que este tumor puede responder a la inmunoterapia [128,149].

La exposición al asbesto causa daño en el DNA y muerte de la célula mesotelial y como consecuencia se libera del núcleo la proteína high-mobility group box 1 (HMGB1), característica de la muerte celular inmunogénica y que recluta activamente macrófagos inflamatorios [150]. Cuando HMGB1 y los macrófagos fagocitan las fibras de asbesto activan Nalp3 e inducen secreción de citoquinas proinflamatorias como IL y TNF alfa [151,152]. El TNF alfa promueve la transformación maligna del mesotelio a través del NFkB que permite a la célula mesotelial con daño en el DNA inducido por asbestos sobrevivir más que morir [50]. Esta inflamación localizada altera la permeabilidad de la membrana mesotelial y facilita el proceso de derrame pleural por el que las proteínas y células del sistema inmune del compartimento vascular se movilizan al espacio pleural estableciendo un ambiente inmune asociado al tumor.



**Figura 22. Mecanismos de carcinogénesis por erionita. Adaptada de Carbone M [153]**

La teoría del reconocimiento inmune del tumor consiste en que las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, internalizan antígenos de las células muertas del tumor y los llevan a los ganglios linfáticos que drenan el tumor. En los ganglios las células dendríticas presentan el antígeno en el complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I) y en presencia de moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras CD8+ resultan en su expansión clonal. Los linfocitos CD8+ activados abandonan el ganglio linfático y entran en circulación y migran hacia el tumor. En el tumor los



linfocitos T citotóxicos efectores reconocen el antígeno expresado en la superficie de las células tumorales en las moléculas del MHC I y específicamente matan a esas células.

La presencia de antígenos asociados a tumor (TAA), ausentes o débilmente expresados en células sanas, es crucial para la integración de una respuesta inmune tumor específica. En MPM se expresan antígenos de diferenciación como la mesotelina y antígenos sobreexpresados como la mucina 1 (Muc-1), Wilms tumor-1 (WT-1), receptor de folato alfa y survivina. En MPM la adquisición de antígenos puede ocurrir en el momento de la transformación maligna, cuando el asbesto induce la muerte de las células mesoteliales que comparten algunos antígenos con las células malignas.

Los principales TAA identificados en MPM son:

- Mesotelina: antígeno de diferenciación que se expresa normalmente en las células mesoteliales pero que se sobreexpresa en los MPM epitelioides, y está ausente en el sarcomatoide [154]. Tanto la mesotelina como la proteína soluble relacionada con la mesotelina se han identificado como biomarcadores de MPM [155]. La mesotelina puede ser una diana terapéutica en las células tumorales por los linfocitos CTL [156].
- WT-1: es un factor de transcripción envuelto en la tumorigénesis que regula genes envueltos en la proliferación celular diferenciación y apoptosis [157]. Esta sobreexpresado en MPM epitelioide, pero no en el sarcomatoide. Su expresión parece tener valor pronóstico [158]. Se ha considerado como una diana inmunológica relevante [159].
- Muc 1: es un antígeno de membrana que se expresa en las células normales mesoteliales entre otros muchos tejidos [160]. Se sobreexpresa en la mayoría de MPM epitelioides [161].

- Survivina: es un miembro de una familia de genes inhibidores de la apoptosis implicada en la división y apoptosis celular. Su expresión es un factor pronóstico negativo en MPM [57]. La survivina es también diana para mediar la muerte por CTL [162].
- FR alfa: es una glicoproteína de superficie de numerosas células epiteliales y se sobreexpresa en 72% de MPM independientemente del subtipo [163]. Se ha considerado una diana terapéutica en el MPM [164].

Para el reconocimiento de las células T es necesario el reconocimiento de los antígenos y la expresión de MHC I por las células tumorales. En MPM existen estudios contradictorios sobre la expresión de MHC I en las células. Inicialmente en un estudio de líneas celulares se demostró que todas las líneas expresaban MHC I y II, pero dos estudios posteriores sólo detectan la presencia de moléculas de MHC I en líneas celulares y en muestras de pacientes con MPM Mutti 1998 [165,166].

## **2.7 Inmunoterapia en MPM**

La combinación de pemetrexed con cisplatino es el tratamiento estándar para el MPM, que alcanza una mejoría de supervivencia de tres meses respecto al cisplatino en monoterapia. Debido a la edad avanzada y comorbilidades de los pacientes muchos no son elegibles para ningún tipo de intervención terapéutica, indicando una necesidad urgente de mejorar los tratamientos.

Se define como inmunoterapia la estrategia que tiene el objetivo de imitar los efectos antitumor del sistema inmune del paciente o ayudarle en su capacidad para luchar contra el cáncer. Estudios clínicos y preclínicos conducidos en los últimos años destacan la sensibilidad del MPM a la inmunoterapia. La inmunoterapia ofrece una alternativa a la terapia convencional utilizando el propio sistema inmune del paciente para luchar contra el cáncer sin

demasiados efectos adversos. Un potencial beneficio adicional es que genera memoria inmunológica a largo plazo que protege contra futuras recaídas.

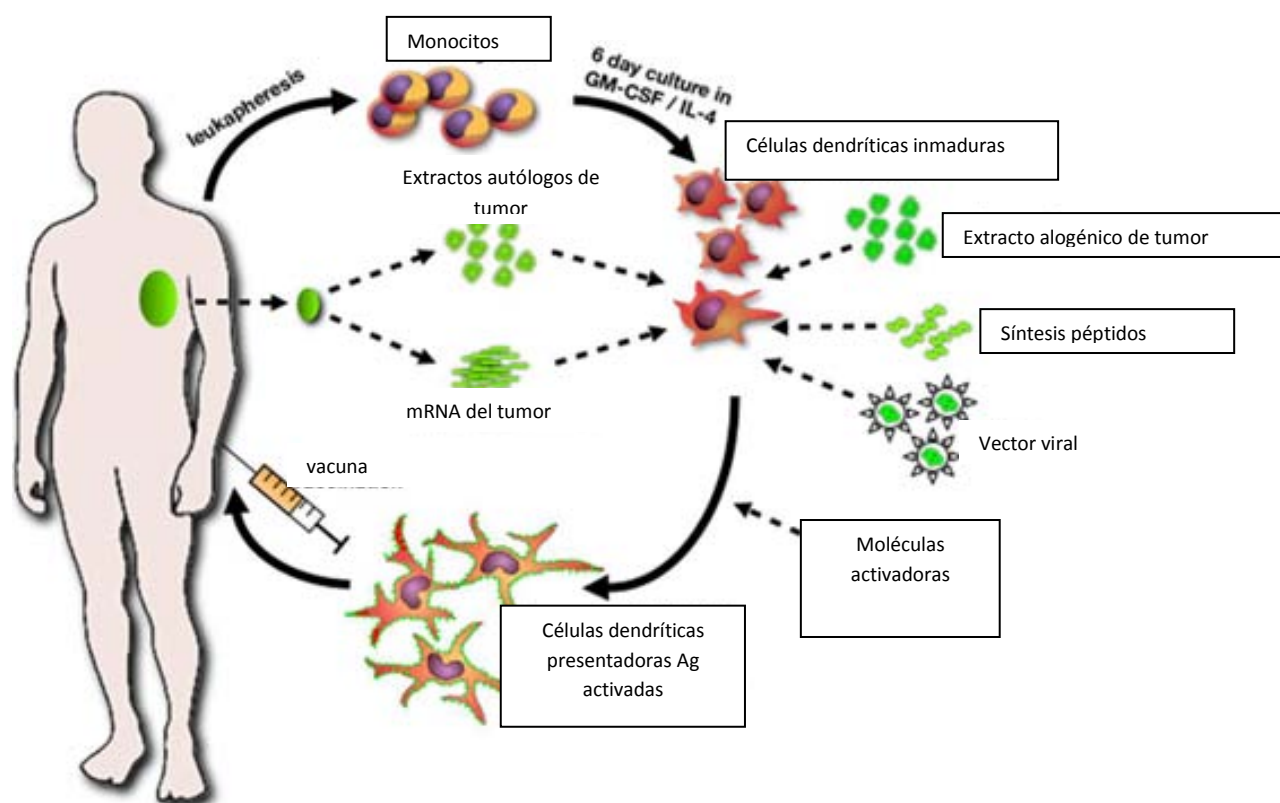
Existen dos tipos de intervenciones inmunológicas, las inmunoterapias dirigidas y las no específicas.

### 2.7.1 Inmunoterapia no específica

Las inmunoterapias no específicas son las que estimulando el sistema inmune en general pueden inducir o amplificar respuestas antitumor con poder suficiente para romper la tolerancia inmune inducida por el tumor, por tanto promoviendo la destrucción del tumor.

Inducen células inmunes efectoras in vivo contra células tumorales a través de la administración de mediadores inmunes capaces de activar el sistema inmune. Ejemplos de esta estrategia incluyen virus modificados que expresan TAA que se inyectan dentro del paciente, vacunas de células dendríticas, depleción de macrófagos y terapias con citoquinas [167].

En MPM como tratamiento se ha investigado inmunoterapia con células dendríticas en un modelo de ratones. Se demostró que la inmunoterapia con células dendríticas induce fuerte respuesta CTL específica que lleva a un aumento de la supervivencia en los ratones [168]. En base a estos datos preclínicos se realizó un ensayo clínico fase I con células dendríticas autólogas del tumor. Se obtenían las células del derrame pleural o de la biopsia de tumor en el momento del diagnóstico. Los pacientes recibían inmunizaciones cada dos semanas. El régimen fue bien tolerado, sin toxicidades grados 3 ó 4. Como toxicidad los pacientes presentaron erupción cutánea local en el sitio de la inyección intradérmica después de la primera vacuna en 8 de 10 pacientes. La mayoría de los pacientes presentaron un cuadro pseudogripal moderado. En las muestras de sangre de los pacientes se detectó un aumento de los anticuerpos reactivos en las muestras postvacunación vs prevacunación demostrando que la vacuna produce inmunoreacción.



**Figura 23. Imagen de modelo de vacuna de células dendríticas. Adaptada de Surmont V [169].**

En MPM se ha investigado el efecto de la depleción de macrófagos en la progresión del tumor en un modelo murino con liposomas de clodronato encapsulado [171]. Estos liposomas son fagocitados por los macrófagos e inducen apoptosis cuando el clodronato se libera en el citoplasma de las células [170]. En otro estudio in vitro se observa inhibición de la diferenciación de las células mieloides a macrófagos cuando se añade ácido zoledrónico a un cultivo in vitro. Se detectó una reducción en el número de macrófagos y un aumento en el número de células mieloides inmaduras, pero no diferencias significativas en la progresión del tumor ni en la supervivencia.

Las citoquinas son los mejores mensajeros del sistema inmune. Se secretan por células tumorales e inmunes y tienen actividad inmunoreguladora. La IL2 y el IFN- $\alpha$ 2b son las dos citoquinas aprobadas por la FDA para el tratamiento del cáncer (melanoma, cáncer renal, linfoma y leucemia).

Los efectos inmunoreguladores del IFN implican la producción de anticuerpos, activación de células NK , linfocitos T, función de macrófagos y expresión de antígenos de MHC [172]. En MPM un ensayo clínico con IFN $\beta$  demostró que la administración de una dosis consiguió respuestas en 4 de 10 pacientes. Al administrar dos dosis no se observó mejoría en la supervivencia debido a la neutralización de anticuerpos anti vector viral. Posteriormente los mismos autores usando IFN alfa2b encuentran que es más potente, con respuesta clínica en 6 de 9 pacientes tratados. Un estudio en 89 pacientes mostró una tasa de respuesta del 20%, y cuando analizaban los datos de los pacientes en estadio I la respuesta subía a un 45% [173].

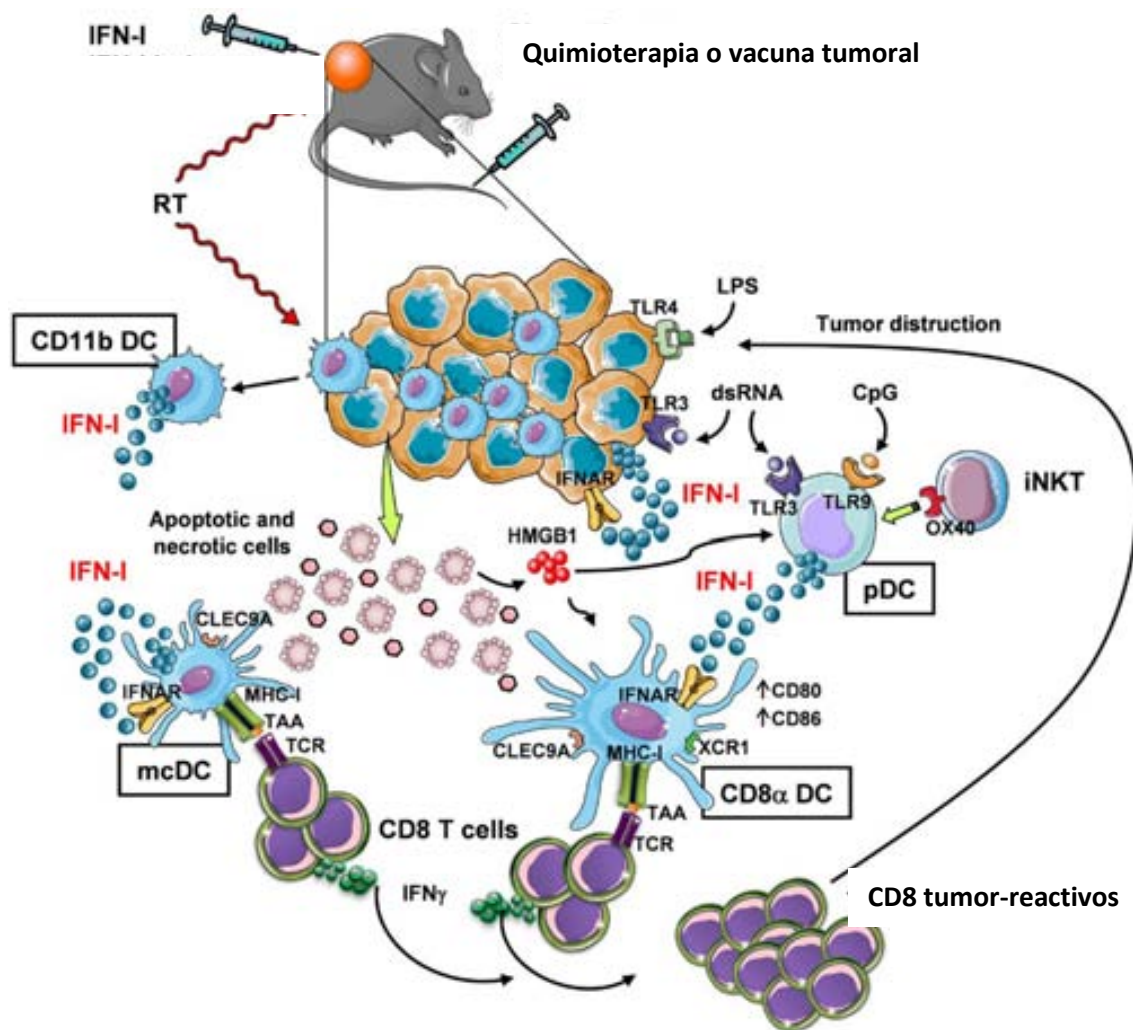


Figura 24. Imagen de modelo de vacunas con interferón. Adaptada de Schiaroni G [174]

Las interleuquinas son otras citoquinas con propiedades inmunoregulatoras. La IL-2 es una citoquina proinflamatoria producida por las células T activadas y promueve la proliferación de las células T, diferenciación y supervivencia. También aumenta las células NK, neutrófilos y función de los macrófagos y puede impulsar la unión de los Treg [175,176]. En estudios de líneas celulares de MPM, la IL-2 afecta al ciclo celular, resultando en una acumulación de células en la fase G0/G1 con posterior apoptosis [177]. En un modelo de ratones la IL-2 rápidamente induce actividad CTL CD8+ y disminuye la vasculatura resultando en regresión tumoral [178]. Otros modelos con ratones han demostrado que la administración intratumoral recluta células inflamatorias al sitio del tumor que resulta en regresión temporal del tumor, pero el recrecimiento es evidente después de finalizar el tratamiento, indicando que no se generó memoria [179,180].

En ensayos clínicos la administración sistémica de IL-2 se asoció a importantes efectos adversos y tasas de respuesta subóptimas [181]. Resultados más prometedores se han logrado con la administración de IL-2 localizada, pero también es más tóxico que el IFN. En un ensayo clínico la administración de IL-2 preoperatoria inducía mayor reclutamiento de células T e inhibía la vasculatura asociada al tumor. Otros efectos de la IL-2 incluyen la resolución de derrame pleural en el 90% de los pacientes [182].

CD40, una glicoproteína de la familia de TNF, administrado en un modelo animal de MPM consigue regresión tanto del tumor como de las metástasis a distancia [183].

### 2.7.2 Inmunoterapia dirigida

Las inmunoterapias dirigidas a un antígeno tumoral, generan o impulsan respuestas inmunes específicas. Utiliza efectores inmunológicos producidos in vitro que son capaces de influenciar en el crecimiento de la célula tumoral.

Varios marcadores tumor específico han sido explorados para terapias dirigidas.

La mesotelina ha demostrado ser una diana de linfocitos ya que los CTL con péptidos específicos hacia la mesotelina pueden lisar el tumor [184]. Además anticuerpos específicos de mesotelina están elevados en el 39% de los pacientes con MPM [185]. Es el antígeno más estudiado en el MPM y para el que existen más tratamientos. En estudios preclínicos con anticuerpos monoclonales se induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo contra células de mesotelioma [186].

SS1P es un anticuerpo murino antimesotelina que en un estudio fase I demostró seguridad de la dosis y modesta actividad clínica [187]. MORAb009 es un anticuerpo quimérico ratón/humano hacia la mesotelina que no demostró respuestas objetivas en un estudio fase I con 13 pacientes [188]. En la actualidad está siendo estudiado en un estudio fase II en pacientes con enfermedad irreseccable en combinación con cisplatino y pemetrexed. CRS-207, vacuna atenuada de listeria que codifica la mesotelina humana, está siendo estudiada en un ensayo fase I.

WT-1 es un péptido mixto que incorpora un epitopo CD8, dos epitopos CD4 y un péptido con ambos epitopos. En un estudio con 9 pacientes se demostró una supervivencia libre de progresión de 36 meses en un paciente [189].

### 2.7.3 Combinación de quimio-immunoterapia

Como la eficacia de la inmunoterapia con un agente único ha sido limitada, la combinación de quimioterapia podría mejorar los resultados.

Estudios recientes se centran en analizar los mecanismos inmunomediados antitumorales de la quimioterapia. La destrucción física de las células tumorales por la quimioterapia las hace más manejables como dianas de un ataque inmune pero además proporciona antígenos tumorales de la vía de la presentación cruzada.

En estudios preclínicos se han sugerido potenciales beneficios de la quimioterapia el aumento de la presentación de antígenos, la activación de células dendríticas, generación de memoria, prevención de la tolerancia por las células tumorales y sensibilización de las células tumorales a la lisis de las células T. Una ventaja adicional de combinar quimio-inmunoterapia es que actúan a través de distintos mecanismos.

El cisplatino aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la muerte inducida por linfocitos T citotóxicos a través de un mecanismo no conocido [190]. Varios estudios con limitado número de pacientes de combinación de cisplatino con IFN no han demostrado mejoría de los resultados [191,192].

La ciclofosfamida en un estudio de ratones con MPM demostró que disminuye un 75% de los linfocitos CD8+ y confiere fuerte respuesta antitumoral con una tasa de curación de los ratones que oscila entre el 75%-100%. La ciclofosfamida sensibiliza las células tumorales a mediar apoptosis por TRAIL (factor de necrosis tumoral relacionado con el ligando).

Melfalán y mitomicina regulan la expresión de moléculas co-estimuladoras de células T llevando a su infiltración tumoral resultando en la muerte de la célula tumoral en modelo de ratón de MPM [193].



Los pacientes tratados con cisplatino y pemetrexed tienen más linfocitos CD8+ que infiltran el tumor en comparación con el esquema de cisplatino y vinorelbina y esto se ha relacionado con una mejoría de la supervivencia, demostrando que estos agentes pueden tener efectos de potenciación inmunológica [194]. Además otro estudio demostró que el pemetrexed aumenta las células inmunes en la superficie de las células tumorales [195]. También se ha demostrado que el pemetrexed induce autofagia llevando a la muerte por apoptosis de las células tumorales [196].

En un modelo murino de mesoteliomas, el pemetrexed mostró sinergia con la depleción de Treg para aumentar la supervivencia de los ratones con mesoteliomas de manera linfocito CD8 dependiente [197]. La combinación se asoció con descenso del número de Treg en el tumor, aumento de la producción de IL-2, maduración de las células dendríticas y aumento del número de CD8+T infiltrantes en el tumor cuando se compara cada agente por separado.

Estudios recientes han demostrado la presencia de células T reguladoras (Treg) en el microambiente del tumor. Los Treg tumor específicos pueden jugar un papel significativo en la supresión de la inmunidad antitumor porque el aumento de estos linfocitos parece asociarse con peor supervivencia en distintos tipos de cáncer [193]. Aunque muchas de las estrategias de depleción de Treg parecen prometedoras, es improbable que puedan ser usadas como una modalidad única para tratar un estadio avanzado de mesotelioma. En su lugar podría tener un papel la combinación de quimioterapia con inmunoterapia. Se sabe que la quimioterapia no tiene siempre un efecto negativo en la respuesta inmune por inducir linfopenia, pero en realidad puede ser compatible o incluso sinérgica con inmunoterapia [198].

Se ha considerado que la quimioterapia es perjudicial para la inmunidad antitumor, porque la dosis limitante de toxicidad de muchas drogas es mielosupresora produciendo neutropenia y linfopenia. En el estudio de Anraku investigaron los efectos de la quimioterapia en combinación con inhibidores de

los Treg en MPM [197]. Demuestran que la combinación de pemetrexed con la depleción de Treg podría llevar a la erradicación de un mesotelioma establecido en ratones, mientras que el pemetrexed y la depleción de Treg por sí solos no tenían un impacto en la supervivencia. El efecto sinérgico del pemetrexed en combinación con la depleción de Treg se asoció con una infiltración intratumoral de células Cd3+Cd8+IFN-g+. Análisis retrospectivos han revelado una correlación significativa entre el infiltrado inmune por los linfocitos TCD8+citotoxicos y mejores resultados.

En un estudio con mesoteliomas murinos se identificó que el aumento de los linfocitos Treg intratumoral es por el aumento de los CD4+T dentro de los tumores cuando crecen. En contraste la proporción de Treg dentro del compartimento en la periferia del tumor permanece relativamente constante cuando el tumor crece [199]. Se ha encontrado una peor supervivencia en los pacientes con MPM y altos niveles de Treg intratumorales [194].

#### 2.7.4. Inhibidores de CTLA4

Una nueva estrategia de inmunoterapia se dirige hacia las moléculas regulatorias expresadas en las células inmunes para aumentar la actividad antitumoral de las células T. El anticuerpo monoclonal antiCTLA4 tremelimumab se desarrolló como una inmunoglobulina IgG2 para reducir la activación del complemento y el riesgo de tormenta de citoquinas. En un estudio con tremelimumab en monoterapia en melanoma avanzado demostró respuestas duraderas [200]. Sin embargo en el estudio fase III en comparación con dacarbazina o temozolamida tremelimumab no mejoró la supervivencia de los pacientes con melanoma aunque se consiguieron respuestas duraderas [201]. En MPM se ha desarrollado un estudio fase II con tremelimumab en Italia [202]. Se incluyeron 29 pacientes que habían recibido una línea de tratamiento previo. Un paciente alcanzó respuesta parcial de más de 6 meses de duración.

El 31% de los pacientes alcanzó estabilización de la enfermedad. La mediana de supervivencia fue de 10.7 meses y la supervivencia libre de progresión de 6.2 meses. Los eventos adversos más comunes fueron dermatológicos y gastrointestinales. Los resultados de supervivencia de 10.7 meses se comparan favorablemente con la de fármacos de segunda línea en mesotelioma [203].

#### 2.7.5 Inhibidores de la vía PD1-PD-L1 en MPM

Hasta el momento la expresión de PD-L1 ha sido estudiada en un estudio de ratones. El receptor inhibitorio de la célula T PD-1 se expresa en los linfocitos activados incluyendo las células Treg que regulan la función de los linfocitos T a través de la interacción con PD-L1. Se ha propuesto un modelo murino de MPM donde PD-1 actúa como el mediador crítico. Con base de que bloquear PD-L1 en modelos animales aumenta la eficacia de diferentes inmunoterapias se sugiere que las respuestas antitumorales de las células T que son inducidas por inmunoterapia son frenadas a través de la vía de PD1/PD-L1 [204,205]. Sin embargo recientemente se ha demostrado que las células T regulatorias CD25 están también bajo el control de PD1, y por tanto el bloqueo de PD-L1 aumenta la función supresora de las células regulatorias T [206]. Con esta base se desarrolló un estudio para investigar el papel de PD1 en la inmunosupresión inducida por el tumor en un modelo animal de MPM en el que la inmunosupresión depende en parte de las células T regulatorias [147]. Para estudiarlo se utilizó una línea celular que se obtuvo de células de mesotelioma inducidas por asbesto. Reportaron que PD-L1 está ubicuamente expresado en el estroma del tumor, que las células CD4 y CD8 expresan PD1, y que el bloqueo de PD-L1 resulta en la activación de las células T. Encontraron que el bloqueo de PD-L1 lleva a la activación de las células CD4 y que potencial bloqueo de PD-L1 mediante la activación de CD8 sólo ocurría cuando las células CD4 estaban agotadas. Los autores sugirieron las células T regulatorias están funcionalmente controladas por PD1, lo que sugiere que las respuestas inmunosupresoras

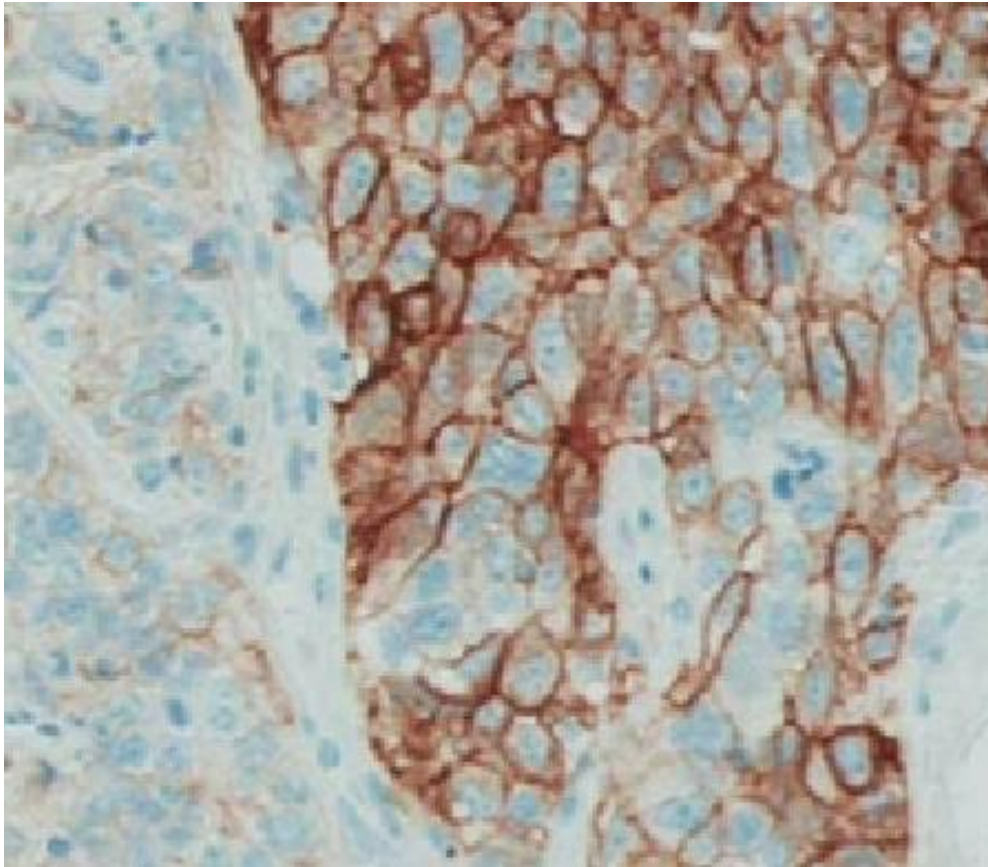
pueden también ser controladas por PD1 y tienen implicaciones para el diseño de inmunoterapias basadas en PD-L1 [147]

## **2.8 Detección de la expresión de PD-L1**

El reciente descubrimiento de la vía de PD1-PD-L1 no ha permitido desarrollar una técnica de inmunohistoquímica estandarizada. En el desarrollo de los ensayos clínicos con fármacos inhibidores de PD1 o de PD-L1 se ha observado de manera retrospectiva que la expresión de PD-L1 medida por inmunohistoquímica predice eficacia de estos fármacos.

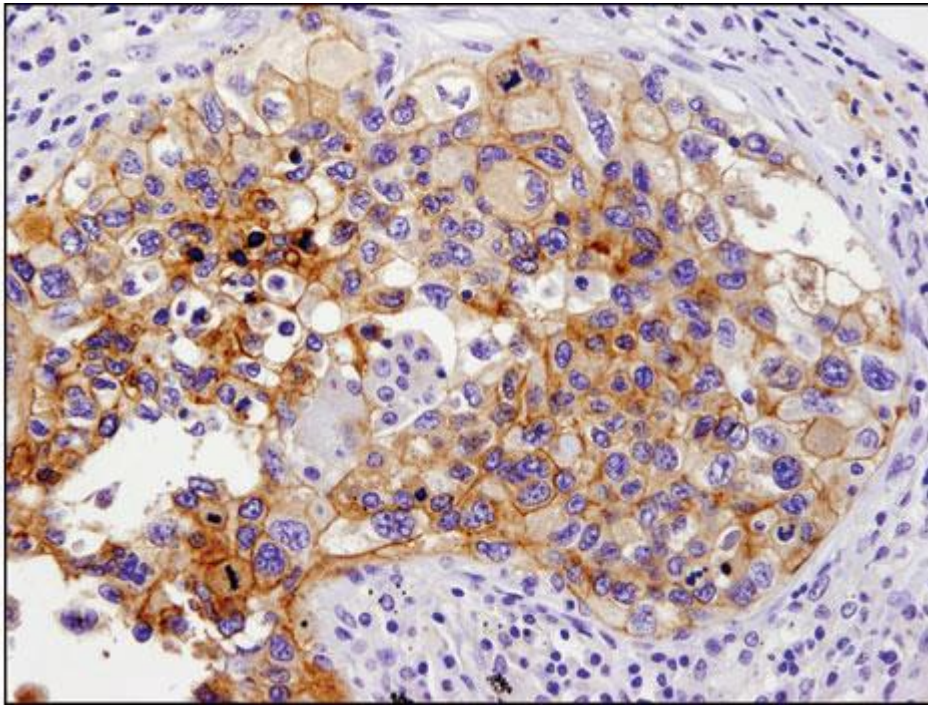
El estudio fase I de nivolumab en pacientes con tumores sólidos, comentado anteriormente, fue el primer estudio que demostró que la expresión de PD-L1 predice respuesta a tratamiento [117]. En el estudio 296 pacientes con tumores sólidos que habían progresado a varias líneas de tratamiento recibieron un inhibidor de PD1. Se evaluó si la positividad de PD-L1 en un grupo de pacientes se relacionaba con respuesta. Utilizaron el anticuerpo monoclonal 5H1 y definieron como positividad la expresión de más de 5% en la membrana de la célula tumoral. De los 42 pacientes evaluados 25 fueron positivos para PD-L1 y 9 pacientes respondieron al tratamiento.

En el estudio de Spiegel con un inhibidor de PD-L1 utilizan un anticuerpo generado por el propio laboratorio (Genentech) para el estudio para evaluar la positividad de PD-L1 [126]. En el estudio con 171 pacientes la expresión de PD-L1 se asocia con beneficio clínico. Definen como positividad de la expresión de PD-L1 la presencia de más de 1% de células inmunes positivas para la tinción.



**Figura 25 Imagen de expresión positiva de PD-L1 con el anticuerpo de Genentech en muestra en parafina**

El anticuerpo PD-L1 (E1L3N™) está en fase de investigación y aún no se han publicado resultados de estudios que utilicen este anticuerpo.



**Figura 26. Imagen de tinción por inmunohistoquímica en muestra en parafina de cáncer de pulmón con el anticuerpo PD-L1 (E1L3N™)XP®**



## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

---

---



## II HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los estudios descritos en la literatura han demostrado que en los pacientes con mesotelioma pleural ocurren alteraciones del sistema inmune provocadas por el tumor.

Recientemente se ha demostrado que la vía de PD1-PD-L1 se expresa en tumores sólidos y, en algunos casos, parece conferir mal pronóstico.

En el momento del diseño de este proyecto de investigación no se dispone en la literatura de estudios que evalúen la presencia de PD-L1 en pacientes con mesotelioma pleural.

En este estudio postulamos que PD-L1 puede estar presente en los pacientes con mesotelioma pleural y empeorar su pronóstico. En caso de confirmarse la presencia de PD-L1 en los pacientes con mesotelioma representaría una potencial diana terapéutica para esta enfermedad.

## **OBJETIVOS**

---

---

### **III OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo primario**

Analizar la expresión de la proteína PD-L1 por medio de técnicas de inmunohistoquímica en una serie de pacientes diagnosticados correlativamente de mesotelioma pleural maligno entre los años 2000 y 2014 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron y en el Hospital Universitario 12 de Octubre

#### **2.2 Objetivos secundarios**

- Describir las características clínicas de nuestra serie de pacientes con mesotelioma pleural
- Analizar los factores pronósticos
- Analizar las diferencias en la expresión de PD-L1 en función de las características clínicas y los subtipos histológicos de los pacientes
- Conocer las diferencias de supervivencia entre los pacientes con PD-L1 positivo y negativo

## **MÉTODOS**

---

## IV MÈTODOS

### 1. Ámbito de desarrollo

Considerando que el MPM es un tumor poco frecuente, con objeto de poder aumentar el tamaño muestral se decidió realizar el estudio con los casos diagnosticados en nuestro hospital y con una serie de pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre. El estudio se realizó entre el año 2013 y el año 2014 en dos hospitales, Hospital Universitario Vall d'Hebron y Hospital Universitario 12 de Octubre.

### 2. Pacientes del estudio

Se analizaron los pacientes diagnosticados de MPM en los dos hospitales en el período tiempo desde el año 2000 hasta el año 2014. Se incluía a un paciente en el estudio si se disponía de material archivado en el servicio de anatomía patológica de ambos hospitales con calidad suficiente para llevar a cabo la tinción (al menos una laminilla no teñida).

Los criterios de inclusión para considerar a los pacientes candidatos para la tinción de PD-L1 fueron:

- Pacientes diagnosticados de MPM que hayan recibido o no tratamiento para su enfermedad
- Pacientes con material histológico disponible para el análisis de inmunohistoquímica
- Pacientes con disponibilidad de acceso a los datos de la historia clínica.
- Pacientes de los que se disponía de seguimiento clínico

Se excluyeron aquellos casos que cumplían alguno de los siguientes criterios:

- Imposibilidad de acceder a los datos de seguimiento clínico
- La calidad de la muestra no permitía una correcta valoración
- Pacientes referidos a nuestros centros desde otros hospitales por dificultad de obtener la información necesaria del seguimiento clínico

Se analizaron de manera retrospectiva las siguientes variables clínicas y patológicas de los pacientes para el análisis descriptivo de la población

- Características demográficas:
  - Sexo
  - Edad (en años) al diagnóstico
  - Hábito tabáquico
  - Estatus funcional (ECOG)(tabla 11)
  - Contacto con amianto
  - Localización anatómica del tumor (derecha o izquierda)
  - Fecha de diagnóstico de mesotelioma
- Parámetros de laboratorio:
  - Leucocitos totales
  - Linfocitos
  - Ratio neutrófilo-linfocitario (NLR)

- Parámetros del tumor
  - Estadío TNM
  - Tipo histológico
  
- Variables de tratamiento
  - Tipo de tratamiento sistémico recibido
  - Respuesta al tratamiento de quimioterapia
  
- Parámetros de supervivencia:
  - Fecha de ultimo control
  - Fecha de progresión
  - Estatus último control: vivo o muerto
  - Fecha de exitus
  
- Parámetros de la vía de PD-L1
  - Resultado de la tinción de PD-L1: positivo, negativo
  - Porcentaje celular en los PD-L1 positivo
  - Localización de la tinción (membrana, citoplasma, infiltrado linfocitario)

**Tabla 11. Estatus funcional (ECOG)**

<b>Grado</b>	<b>ECOG</b>
<b>0</b>	Totalmente asintomático, capaz realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria llevar una vida normal sin restricción
<b>1</b>	El paciente presenta síntomas que le impiden realizar trabajos arduos, aunque se desempeña normalmente en sus actividades cotidianas y en trabajos ligeros. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno
<b>2</b>	El paciente no es capaz de desempeñar ningún trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface sus necesidades personales solo
<b>3</b>	El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria como por ejemplo vestirse
<b>4</b>	El paciente permanece encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para todas las actividades de la vida diaria, como por ejemplo la higiene corporal, la movilización en la cama y la alimentación
<b>5</b>	Paciente fallecido



### **3. Procedimientos del estudio**

#### 3.1 Anticuerpo utilizado

Debido a la falta de un anticuerpo comercial hacia PD-L1, para llevar a cabo el proyecto se utilizó el anticuerpo experimental PD-L1 (E1L3N™) XP® de Cell Signaling solicitando al laboratorio la cesión de una alícuota del anticuerpo para realizar este estudio. Se obtuvo un acuerdo de transferencia para este estudio por parte de la compañía autorizando el uso de este anticuerpo no comercializado.

#### 3.2 Selección de muestras

Las muestras se recogieron de los laboratorios de anatomía patológica de ambos hospitales. Se utilizaron muestras archivadas en parafina. Se empleó una laminilla no teñida para el análisis de PD-L1

#### 3.3 Técnicas de inmunohistoquímica

Las muestras de tumor se obtuvieron de la biopsia del diagnóstico inicial de mesotelioma. Ningún paciente recibió tratamiento neoadyuvante. Los casos incluyeron los subtipos de mesotelioma epitelial, sarcomatoide y bifásico.

Todas las muestras de tumor de los pacientes se obtuvieron de bloques de parafina almacenados en el archivo de anatomía patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron y el Hospital Universitario 12 de Octubre. El mismo método se utilizó para cada paciente. La aprobación del uso del tejido en investigación se obtuvo de los Comités Éticos del Hospital Vall d'Hebron y del Hospital 12 de Octubre. Todas las muestras fueron evaluadas por dos patólogos de manera independiente. Las muestras con material insuficiente para la tinción

de inmunohistoquímica fueron descartadas. La interpretación de los resultados de inmunohistoquímica se realizó por los dos patólogos de manera independiente. Los casos con resultados conflictivos fueron reevaluados hasta la obtención de consenso.

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron como se ha descrito previamente [35]. En resumen secciones de 2 ó 3 micras eran desparafinadas, rehidratadas en alcoholes y aclaradas en agua destilada. La actividad de la peroxidasa endógena era bloqueada con peróxido de hidrogeno al 3% en salino fosfatasa-buffer (PBS) por 15 minutos, seguido de tres lavados de PBS. La retirada del antígeno se hizo con Cell Conditioning 2, prediluido ph8. Las secciones fueron bloqueadas al 3% por 5 minutos y se incubaron en la noche a 4°C con el anticuerpo específico.

La inmunoreactividad se obtuvo con tetrahidroclorido 3´3´diaminobenzidina y las secciones se contaron en hematoxilina de Harry y se deshidrataron previo al montaje en el microscopio electrónico. Las laminillas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos y expuestas toda la noche a 4°C al anticuerpo PD-L1 (E1L3N™) XP® de Cell Signaling a la dilución 1:1200. Como control positivo de la tinción se utilizó tejido de placenta humana.

Antes de la tinción, especímenes sin células tumorales o con células cuestionables de aspecto de células inflamatorias se excluyeron del análisis. La expresión de PD-L1 evaluó en membrana, citoplasma e infiltrado inflamatorio. El porcentaje de células tumorales teñidas se evaluó en una sección completa.

### 3.4 Interpretación de las muestras

Las muestras fueron analizadas por dos patólogos de manera independiente. Se consideró un resultado positivo para la tinción la presencia de más de 1% de células tumorales con expresión positiva para PD-L1. La intensidad de la inmunotinción se clasificó de manera semicuantitativa como sigue: 0, no tinción,

1 débil, 2 moderada y 3 intensa. La expresión de la proteína se analizó en tres regiones celulares: membrana, citoplasma e infiltrado inflamatorio.

Se establecieron tres categorías dentro de los pacientes PD-L1 positivos en función del porcentaje celular que expresa PD-L1: los positivos débiles (aquellos con una tinción en menos del 5% de las células tumorales) los positivos moderados (entre 5-10% de las células tumorales) y los intensos (más de 10% de las células tumorales).

Los linfocitos CD4 y CD8 se evaluaron como score 0, no tinción, 1 leve, 2 moderada y 3 severa.

### 3.5 Recogida de información y valoración clínica de los resultados

Posteriormente a la lectura de las muestras por el patólogo, se consultaron las historias clínicas de los pacientes para obtener información de interés para el estudio. Al finalizar el seguimiento se realizaba una valoración definitiva de la evolución de la enfermedad del paciente que era lo que se tuvo en cuenta para el análisis final de este estudio.

La información epidemiológica, de seguimiento clínico y los resultados de las pruebas de imagen y patológicas se obtuvo consultando las historias clínicas electrónicas y en papel archivadas en ambos hospitales. A través de las historias clínicas de los centros se recogieron las variables demográficas, parámetros de laboratorio y de radiología, información de tratamiento y fechas para el análisis de supervivencia.

#### **4. Análisis estadístico**

Las variables de interés fueron exportadas a una base de datos Excel y previo al análisis se realizó un control de calidad de la información. Se revisaron todos los casos incluidos. Se eliminó a todos aquellos pacientes con información insuficiente o no fiable.

Las variables categóricas se describieron por porcentajes, y las continuas con media y distribución estándar cuando tenían una distribución normal, y mediana y rango intercuartil cuando la distribución no era normal.

Se calcularon la frecuencia y porcentajes de positividad de PD-L1 según diferentes grupos clínicos. El test de Pearson X<sup>2</sup> y el test exacto de Fisher se usaron para evaluar la asociación entre la expresión de la proteína con características clínicas como edad, estadio tumoral y tipo histológico. La posibilidad de que el PD-L1 se asociara con supervivencia se calculó mediante el test de Wilcoxon y el nivel de significación estadístico fue establecido para un valor de  $p < 0.05$ .

La supervivencia libre de progresión se definió como el tiempo desde el final del primer tratamiento hasta el primer evento (progresión o muerte por cualquier causa). La supervivencia global se calculó desde la fecha del diagnóstico de malignidad hasta la muerte por cualquier causa o hasta la fecha de la última visita de seguimiento para los pacientes aún vivos. El análisis de supervivencia que comparó los tumores con alta y baja expresión de proteína se llevó a cabo mediante las curvas de Kaplan-Meier y el significado se verificó por el log-rank test. Todos los valores de la  $p$  se determinaron por dos colas. El análisis multivariante se realizó mediante el análisis de regresión de Cox incluyendo sólo las variables que mostraron significancia en el análisis univariante. El análisis de los datos y la elaboración de las gráficas se realizaron con el software PASW 17.0.2

## **5. Consideraciones éticas**

Se elaboró un modelo de consentimiento informado para presentar a los pacientes.

El protocolo del estudio y su consentimiento informado fue aprobado por el Comité Ético de ambos hospitales. El paciente firmaba el consentimiento informado del estudio en la primera visita que tuviera en el hospital.

La base de datos del estudio se guardó de forma codificada en un ordenador protegido con usuario y contraseña y sólo tenían acceso los investigadores principales del estudio. No se guardó información personal con la que se pudiera inferir en la identidad de los pacientes.

## **RESULTADOS**

---

## V RESULTADOS

Desde el año 2000 hasta el 2014, se recogieron 119 pacientes para este estudio de los que se disponía de toda la información clínica y seguimiento, 61 en el Hospital Vall d'Hebron y 58 en el Hospital 12 de Octubre.

### 1. Análisis descriptivo de los pacientes con MPM

La edad media al diagnóstico es de 69 años (rango de 42 a 90 años). La mayoría de pacientes eran hombres (71.4%), fumadores (51%) y tenían contacto previo con el amianto (44.5%)

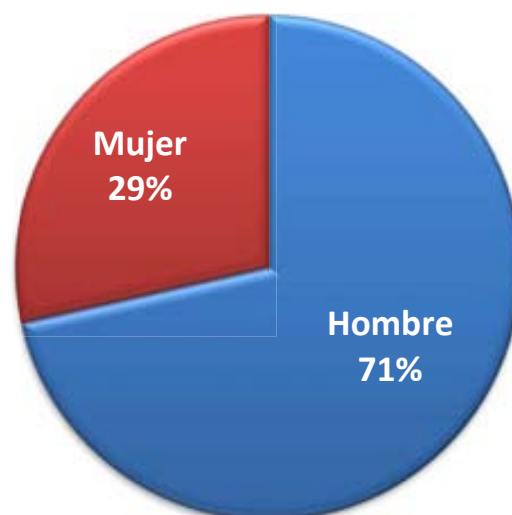
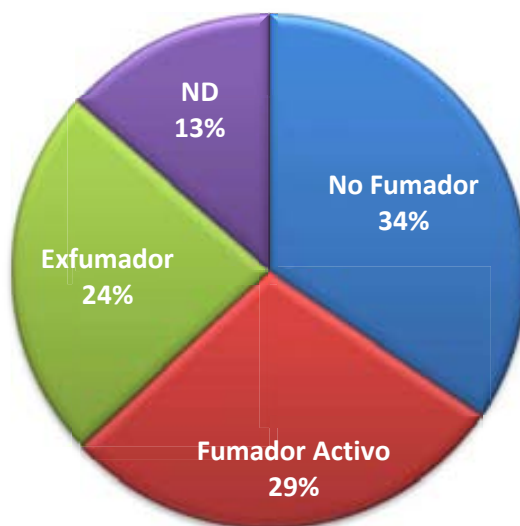
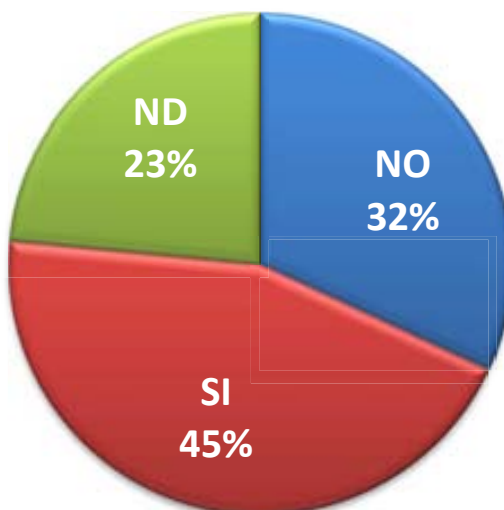


Figura 27. Diagrama de distribución por sexo



ND: no disponible

**Figura 28. Diagrama de distribución por hábito tabáquico**

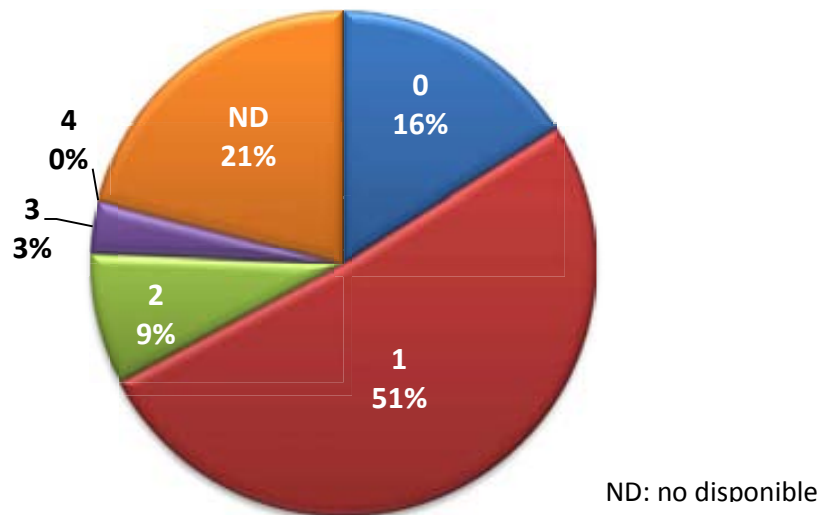


ND: no disponible

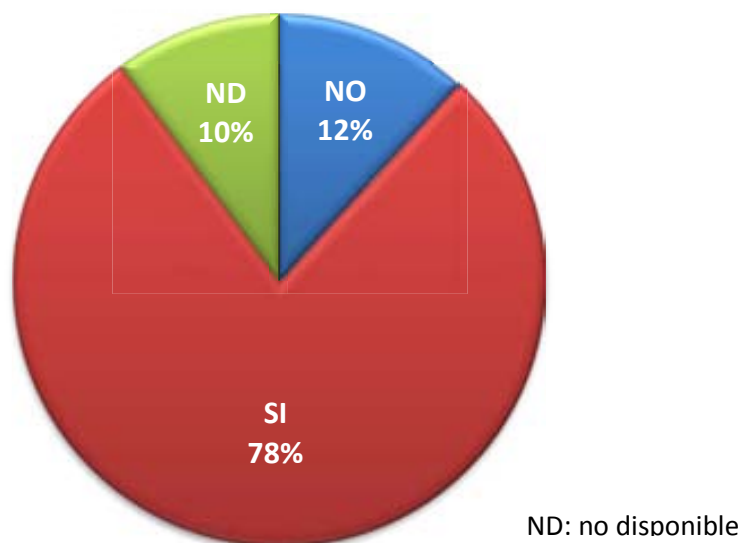
**Figura 29. Diagrama de distribución por contacto amianto**



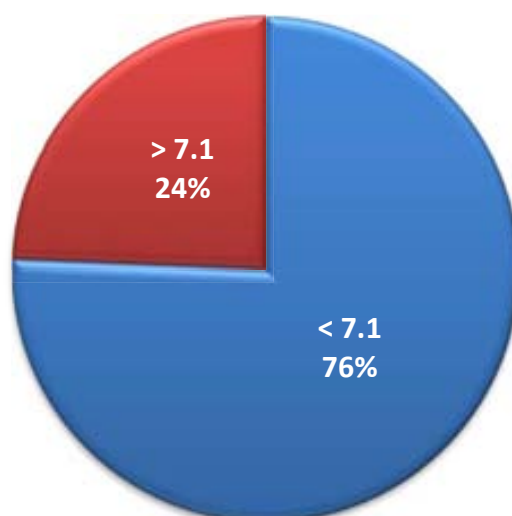
Respecto a los síntomas la mayoría de pacientes tenían un buen estado general con ECOG 0 el 20% de los pacientes y ECOG 1 el 64.8% de los pacientes. El 77% de los pacientes presentaban derrame pleural. La media del ratio NLR era de 7.1 (rango 2-42)



**Figura 30. Diagrama de distribución por ECOG**

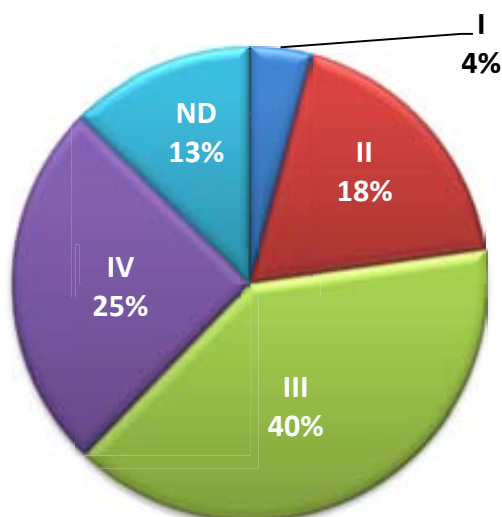


**Figura 31. Diagrama de distribución por derrame pleural**



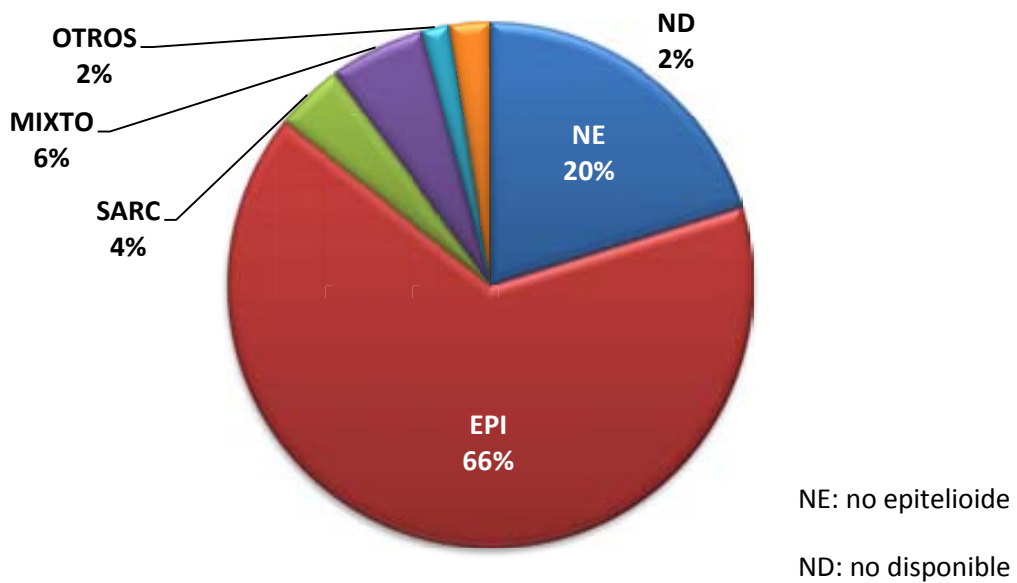
**Figura 32. Diagrama de distribución por NLR**

Respecto al estadio TNM un 39% de los pacientes tenían estadio III y el 25% estadio IV. El tipo histológico más frecuente era el epitelioide (65% de los pacientes), seguido de mesotelioma sin más especificación (20%)



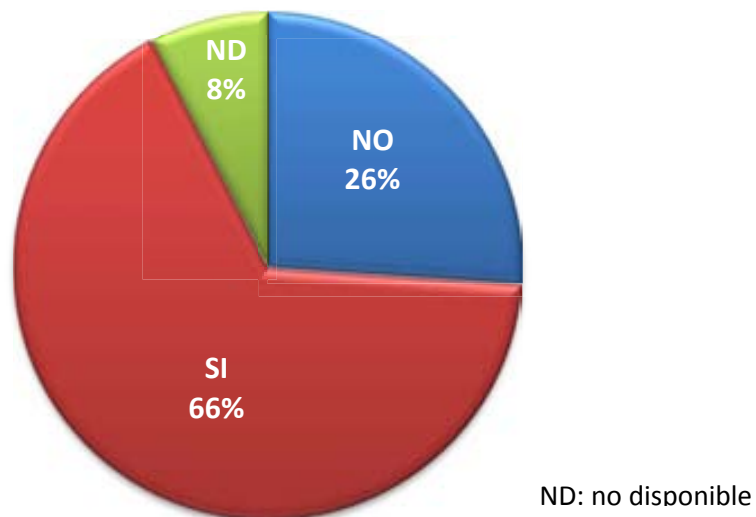
ND: no disponible

**Figura 33. Diagrama de distribución por estadio clínico**

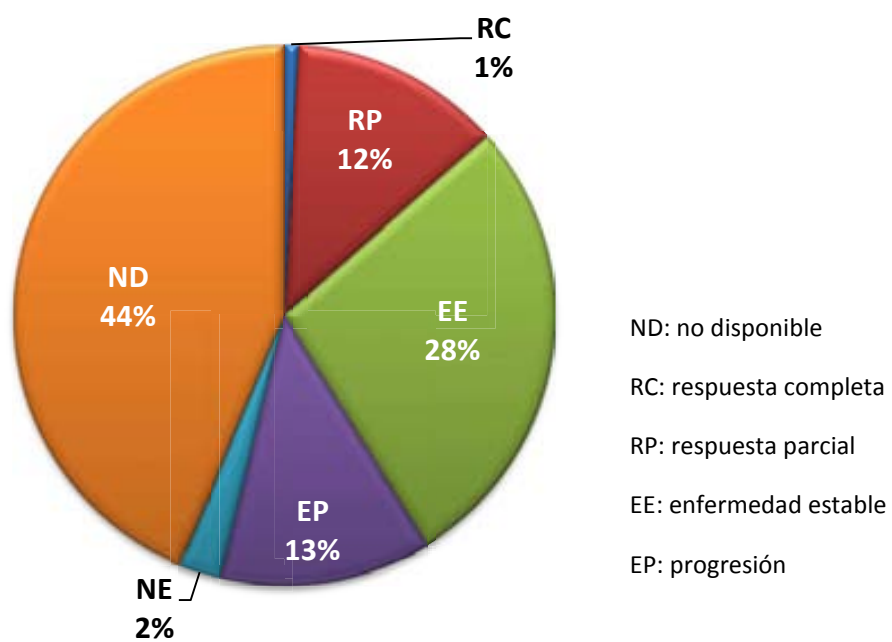


**Figura 34. Diagrama de distribución por histología**

La mayoría de los pacientes (65.5%) recibieron tratamiento sistémico y un 27% de ellos alcanzaron enfermedad estable y 12% respuesta parcial.



**Figura 35. Diagrama de distribución por tratamiento**



**Figura 36. Diagrama de distribución por respuesta al tratamiento**

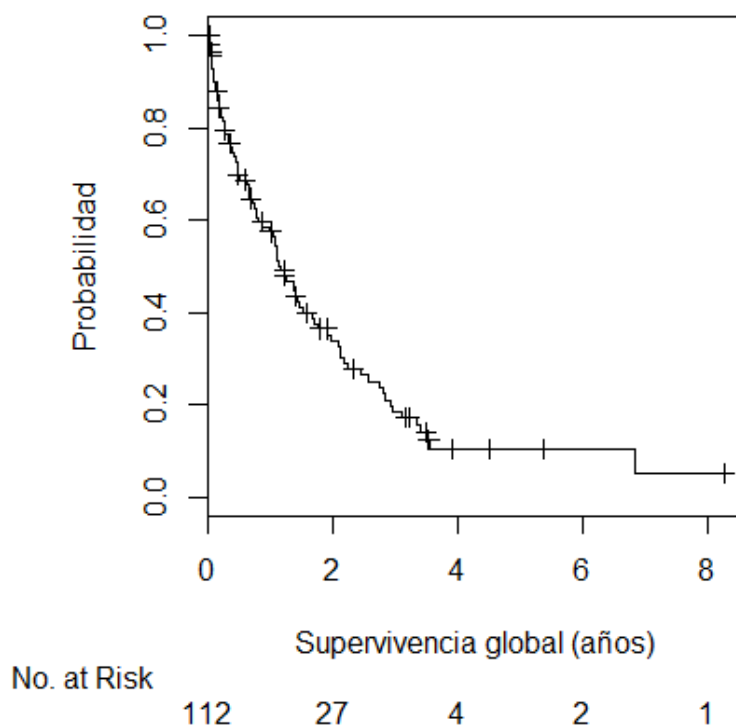
Tabla 12. Características de los pacientes

Característica	N	%
<b>Edad</b>	69 (42-90)	
<b>Sexo</b>		
Hombre	85	71.4
Mujer	34	28.5
<b>Contacto amianto</b>	53	44.5
<b>ECOG</b>		
0	19	15.1
1	61	64.8
2	10	10.6
3	4	4.2
ND	25	13.1
<b>Derrame pleural</b>	92	77.1
<b>NLR</b>	7.10 (2-42)	
<b>Estadio</b>		
I-II	27	22.6
III	47	39.5
IV	30	25.2
ND	15	12.6
<b>Histología</b>		
Epitelioide	78	65.5
Sarcomatoide	5	4.20
Bifásico	7	5.8
No especificación	24	20
Otros	3	2.5
ND	2	1.7
<b>Tratamiento sistémico</b>	78	65.5

ND: No disponible

## 2. Análisis de supervivencia y factores pronósticos

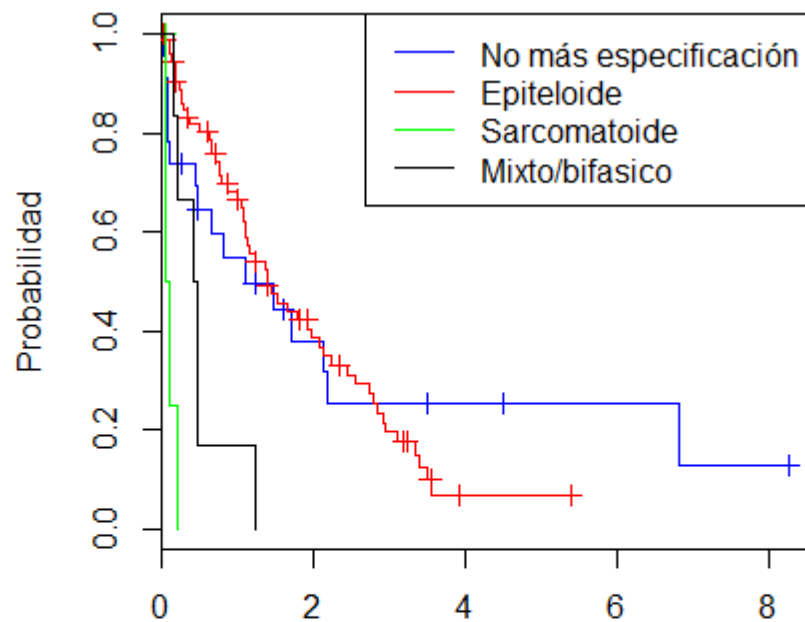
La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 9.8 meses. La supervivencia global de toda la población fue de 13.8 meses



**Figura 37. Gráfica de supervivencia global**

## 2.1 Supervivencia según histología

Los pacientes con histología epitelioide presentaron mejor supervivencia que el resto de histologías con una media de 16.8 meses frente a 5.2 meses los bifásicos y 0.8 meses los sarcomatoides ( $p < 0.001$ )

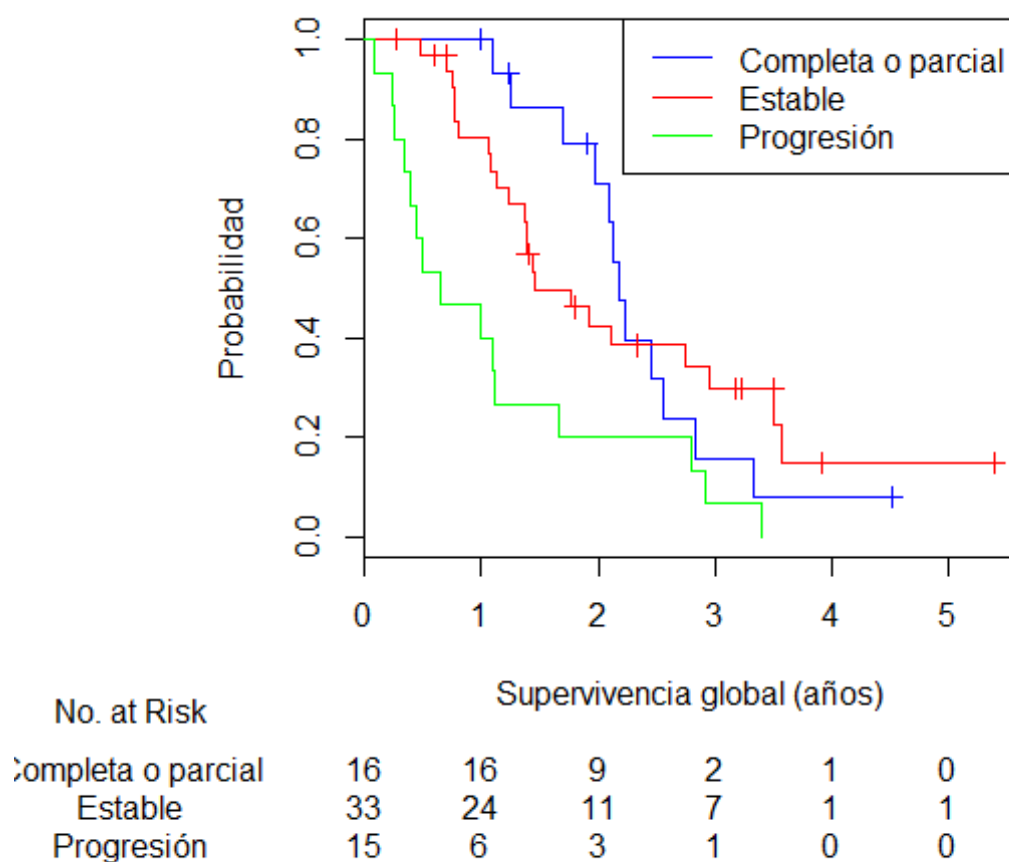


No. at Risk	Supervivencia global (años)				
	0	2	4	6	8
No más esp.	23	6	3	2	1
Epitelioide	75	21	1	0	0
Sarcomatoide	5	0	0	0	0
Mixto/bifásico	6	0	0	0	0

**Figura 38. Supervivencia según histología**

## 2.2 Supervivencia según respuesta a la quimioterapia

Los pacientes que consiguieron respuesta parcial presentaron una mejor supervivencia que los pacientes con enfermedad estable o progresión (26.6 m, 17.5m y 7.8 m respectivamente,  $p=0.003$ )

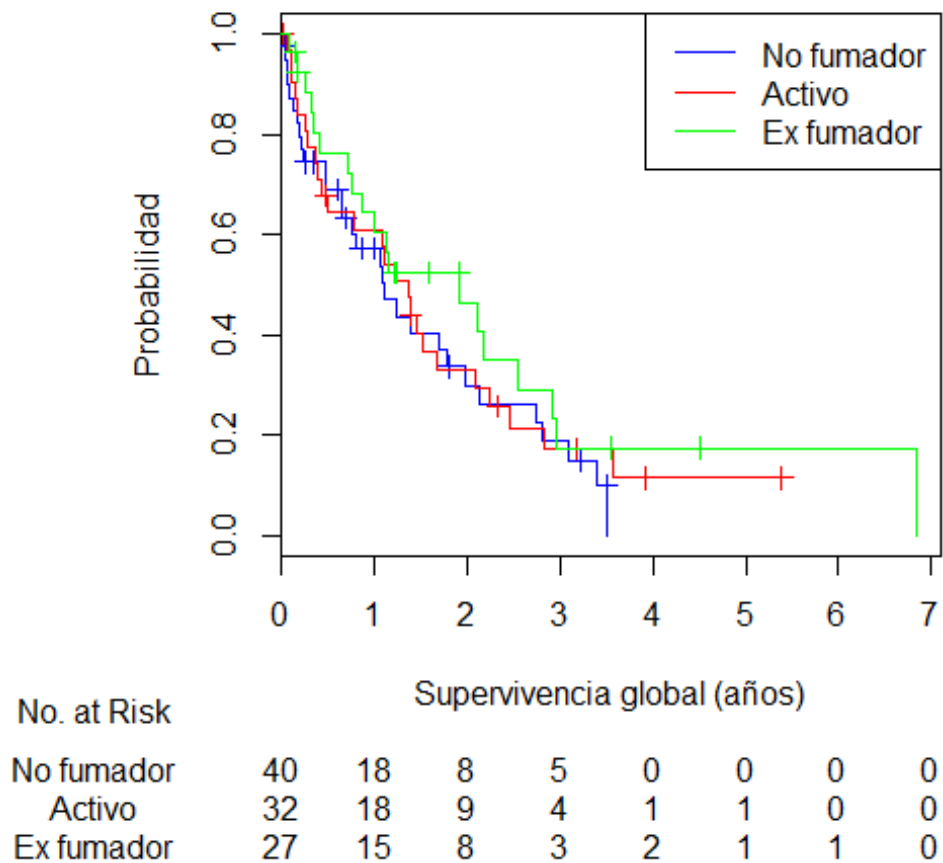


**Figura 39. Gráfica de supervivencia según respuesta a la quimioterapia**



### 2.3 Supervivencia según el hábito tabáquico

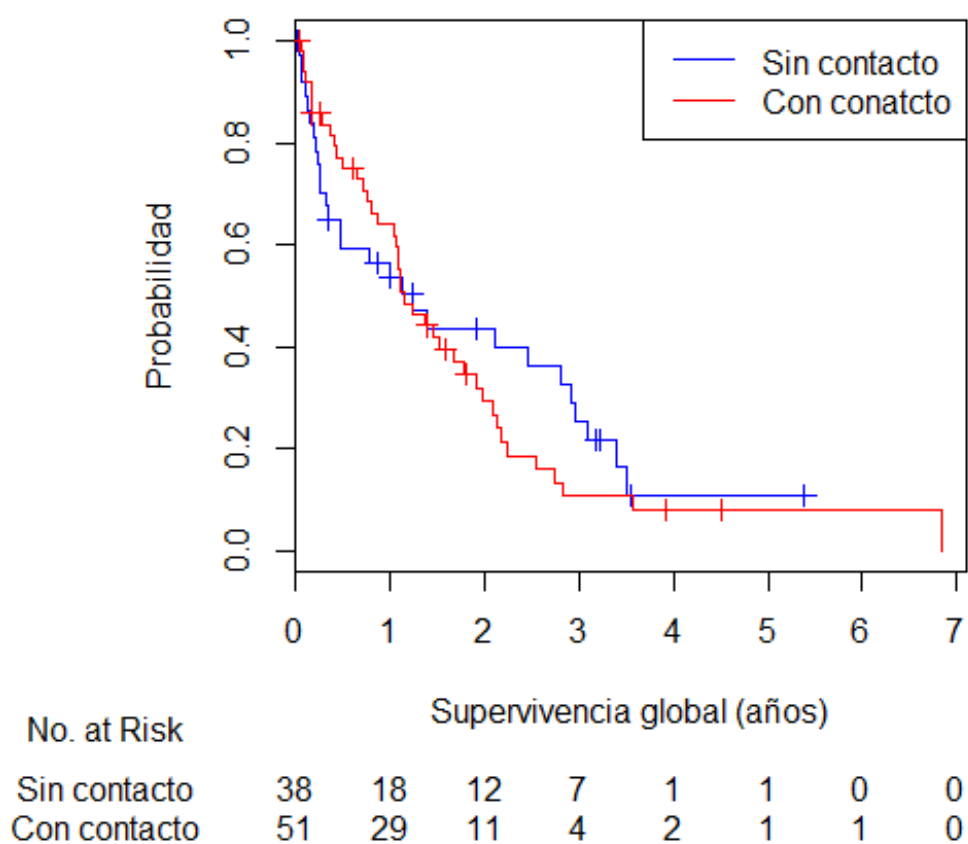
Los pacientes no fumadores tenían una supervivencia de 13.2 meses, frente a 16.44 meses los fumadores activos y 23.1 meses los ex -fumadores ( $p=0.491$ )



**Figura 40. Gráfica de supervivencia según hábito tabáquico**

## 2.4 Supervivencia según el contacto con amianto

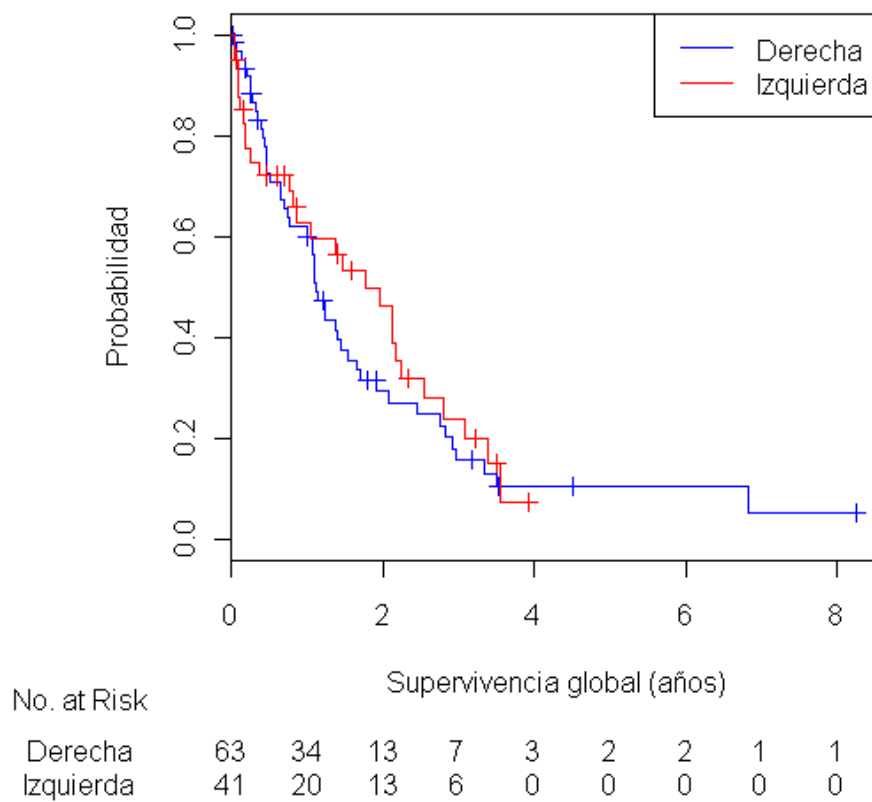
No se observaron diferencias en la supervivencia entre los pacientes que tenían contacto previo con el amianto o derivados (15 meses) y los que no tenían contacto con el amianto (13.8 meses),  $p=0.577$ .



**Figura 41. Gráfica de supervivencia según contacto amianto**

## 2.5 Supervivencia según la localización del tumor

No se observaron diferencias de supervivencia entre los pacientes que presentaban tumor localizado a la derecha o a la izquierda (13.5 meses versus 20.4 meses respectivamente,  $p=0.572$ )



**Figura 42. Gráfica de supervivencia según localización del tumor**

## 2.6 Supervivencia según el estadio clínico

Los pacientes con estadio I alcanzaron una supervivencia de 40.1 meses, los pacientes estadio II de 16.4 meses, los pacientes estadio III de 13.2 meses y los pacientes estadio IV de 13.3 meses ( $p=0.271$ )

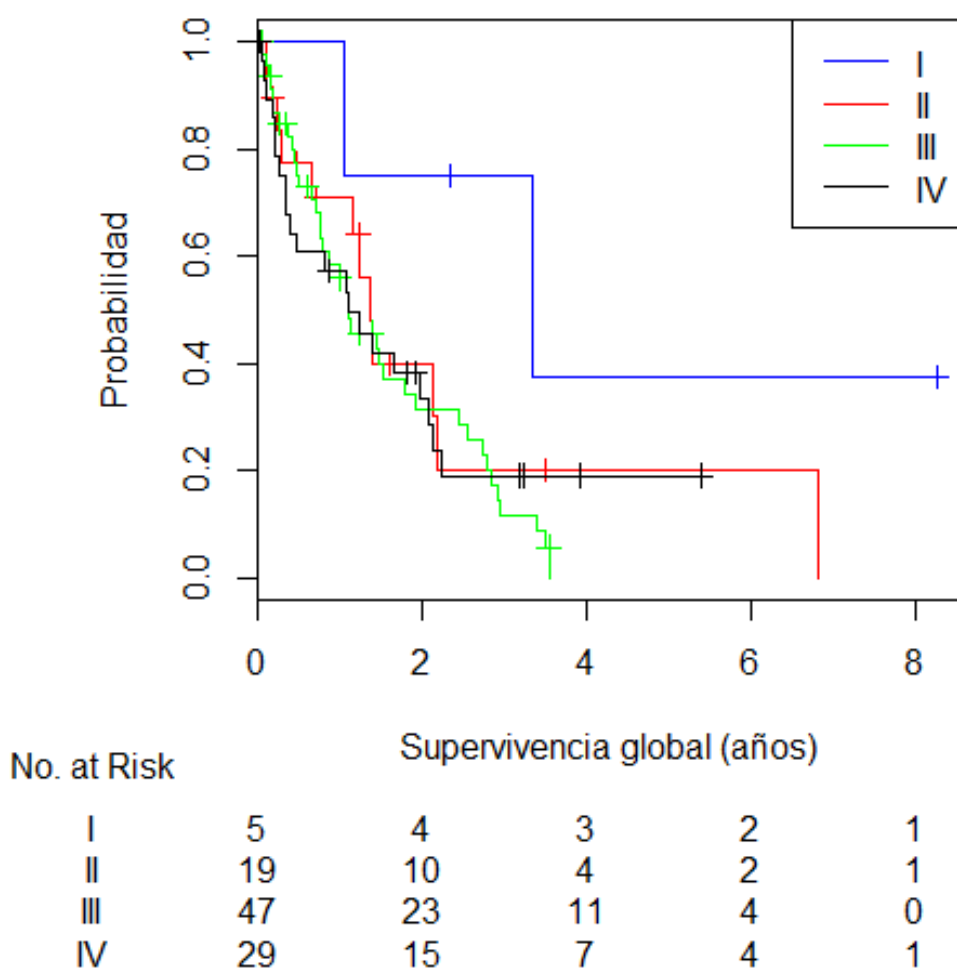


Figura 43. Gráfica de supervivencia según estadio clínico

## 2.7 Supervivencia según la edad

No se observaron diferencias de supervivencia en la población de acuerdo a la edad de más o menos de 75 años (7.9 versus 17.2 meses respectivamente,  $p=0.407$ ).

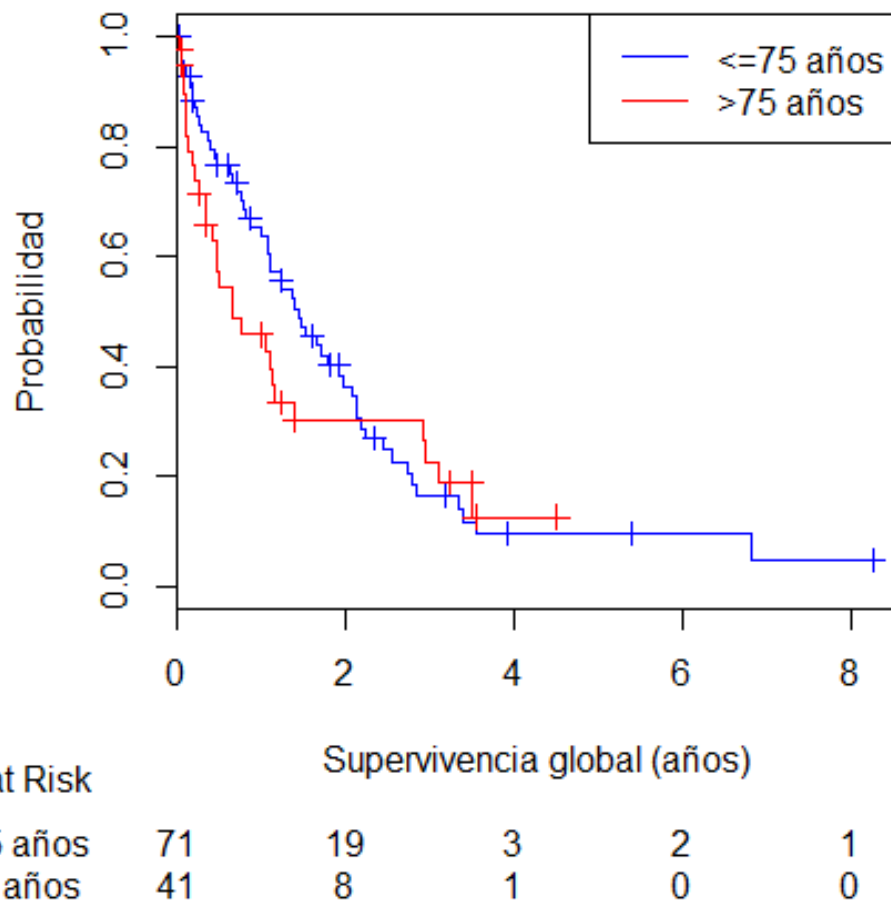


Figura 44. Gráfica de supervivencia según edad

## 2.8 Supervivencia según el sexo

La mediana de supervivencia de los hombres fue de 13.5 meses frente a 16.8 meses las mujeres ( $p=0.863$ ).

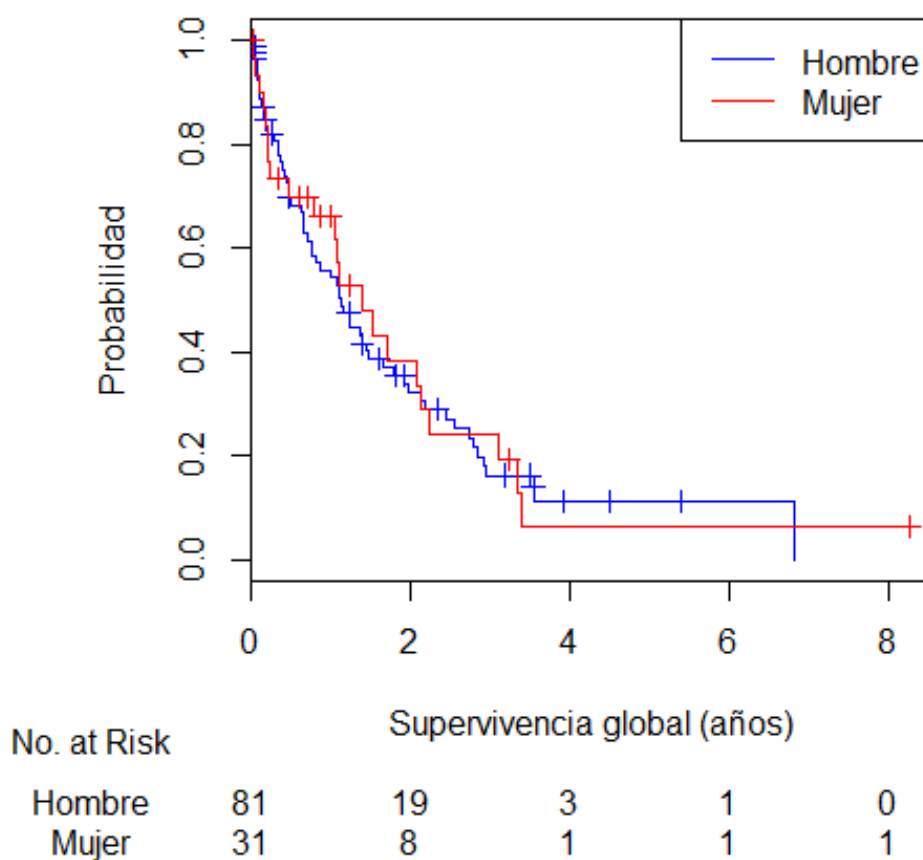
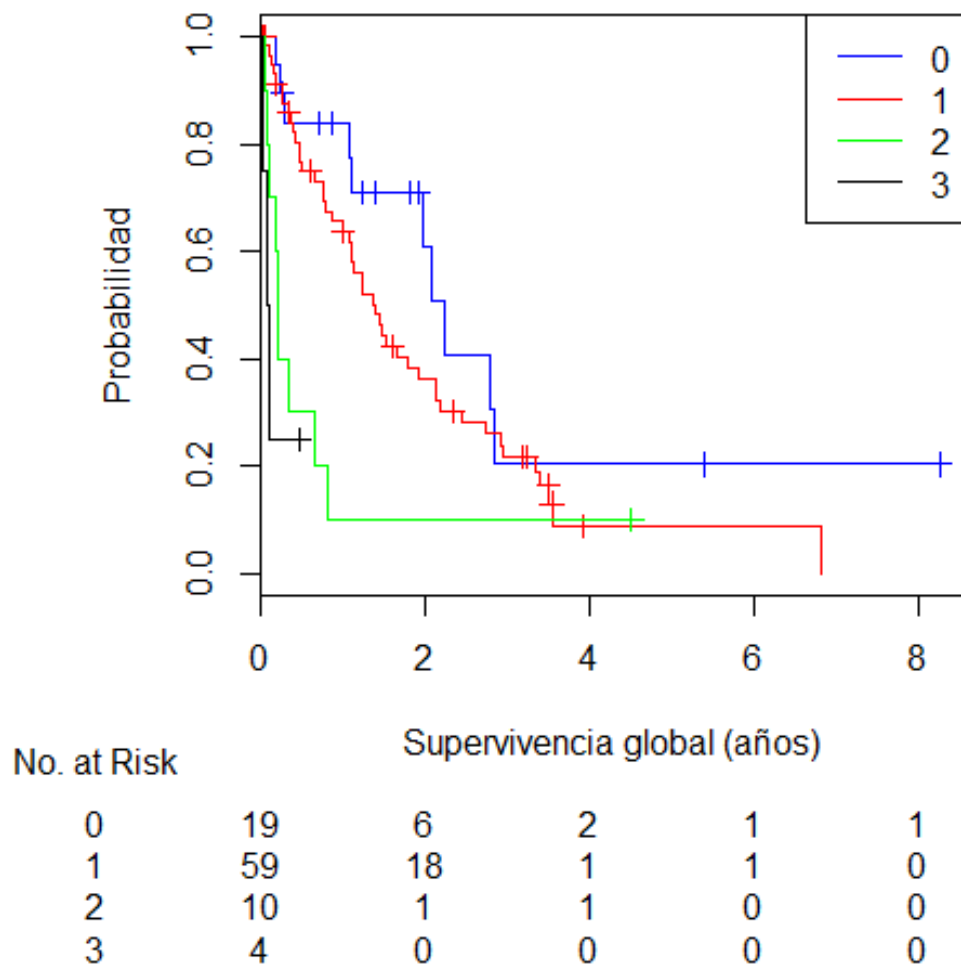


Figura 45. Gráfica de supervivencia según sexo

## 2.9 Supervivencia según el estado funcional

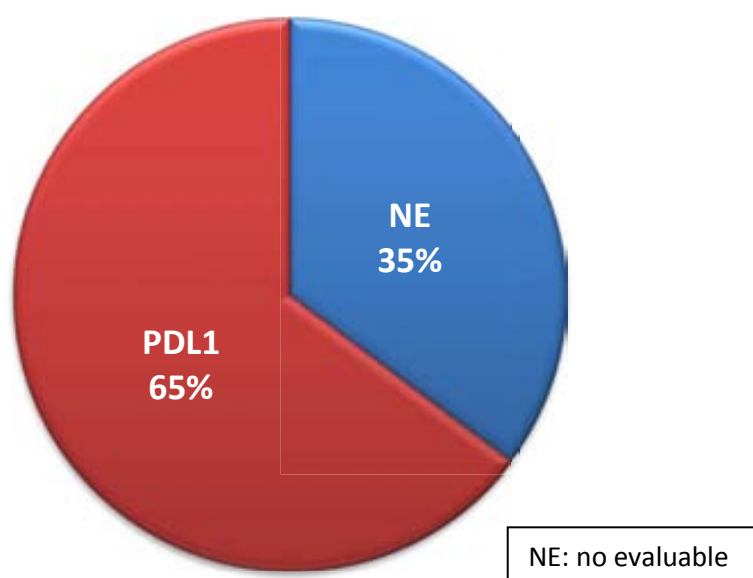
En nuestra serie encontramos diferencias estadísticamente significativas en función del estado funcional. Los pacientes con ECOG 0 tenían una supervivencia de 26.7 meses, los pacientes con ECOG 1 de 16.5 meses, los pacientes con ECOG 2 de 2.5 meses y los pacientes con ECOG 3 de 0.9 meses ( $p < 0.001$ ).



**Figura 46. Gráfica de supervivencia según ECOG**

### 3. Análisis de la expresión de PD-L1

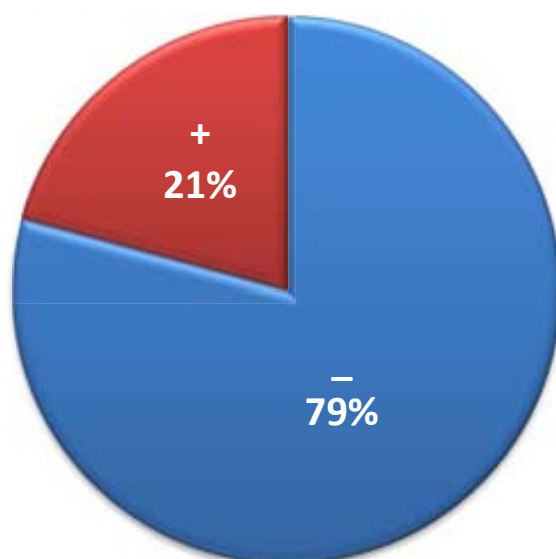
De la serie inicial de 119 pacientes se disponía de material archivado de suficiente calidad para proceder al análisis de inmunohistoquímica en 77 pacientes.



**Figura 47. Distribución de pacientes evaluados para PD-L1**

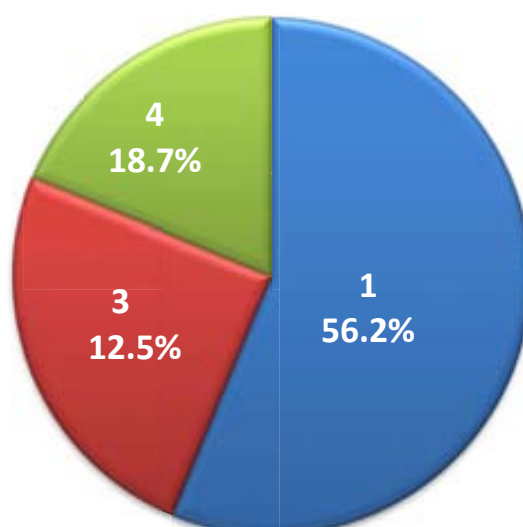
De los 77 pacientes en los que se realizó la tinción de PD-L1 encontramos 16 pacientes con expresión positiva por inmunohistoquímica de PD-L1 (20.7%).



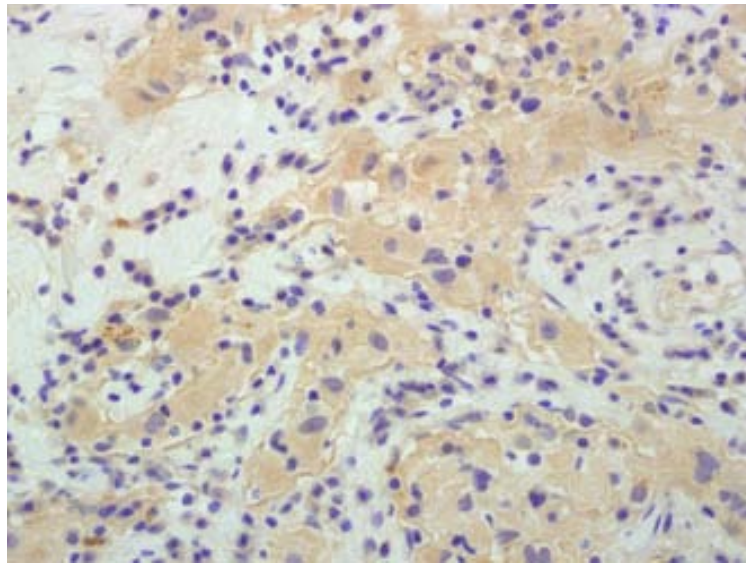


**Figura 48. Positividad de PD-L1**

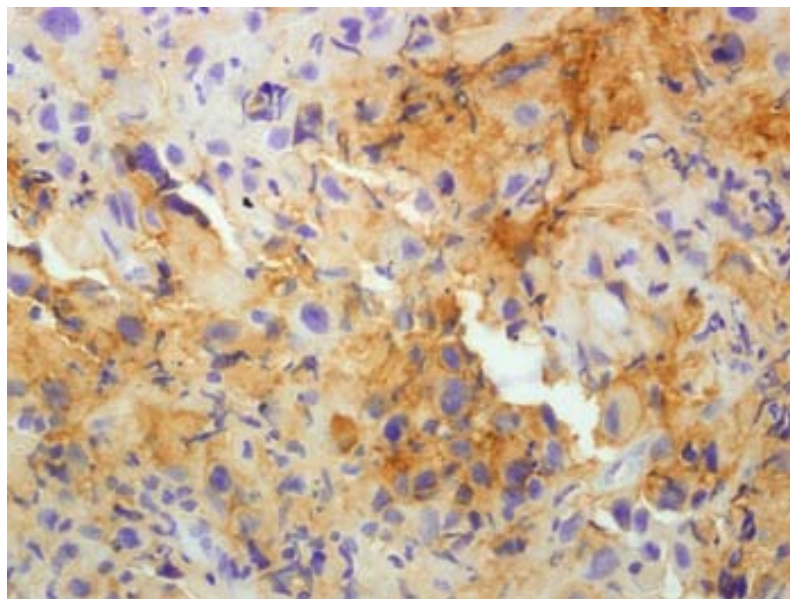
De los 16 pacientes con resultado positivo de PD-L1 en 9 pacientes la tinción era débil (56.2%), en 4 pacientes el resultado de la tinción era positivo moderado (18.7%), y en tres positivo intenso (12.5%)



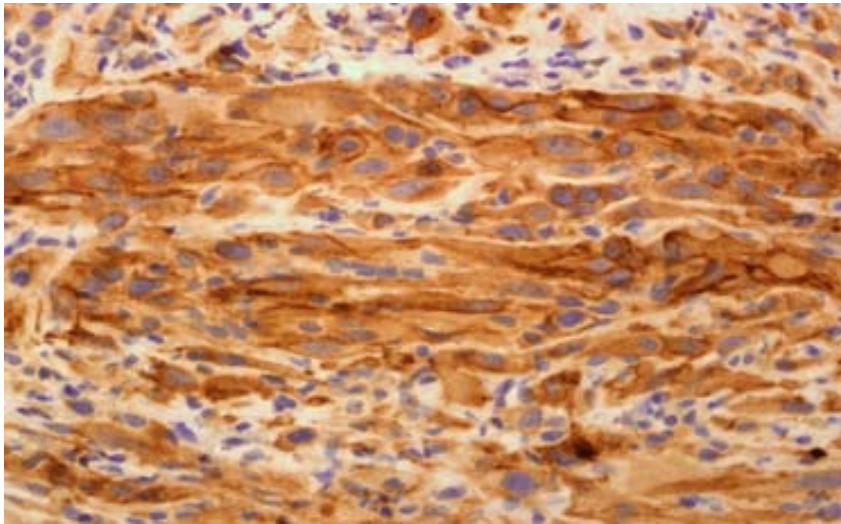
**Figura 49. Intensidad de la tinción de PD-L1**



**Figura 50. Imagen de tinción positiva débil de PD-L1**

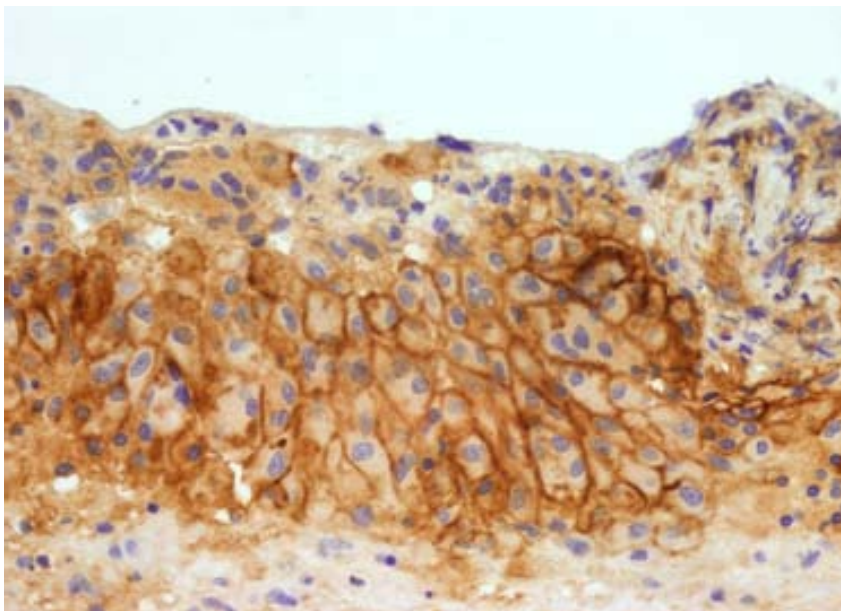


**Figura 51. Imagen de tinción positiva moderada de PD-L1**

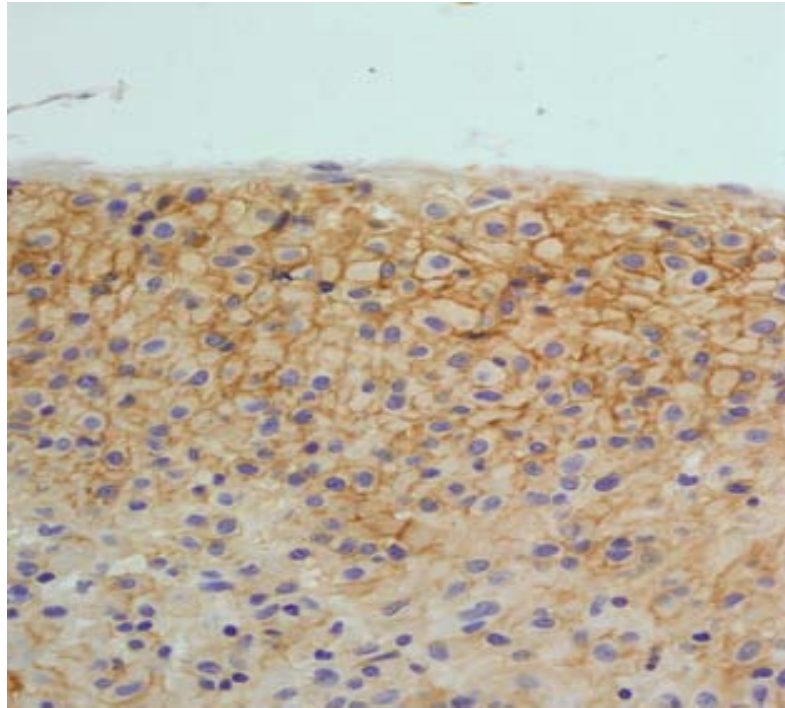


**Figura 52. Imagen de tinción positiva intensa de PD-L1**

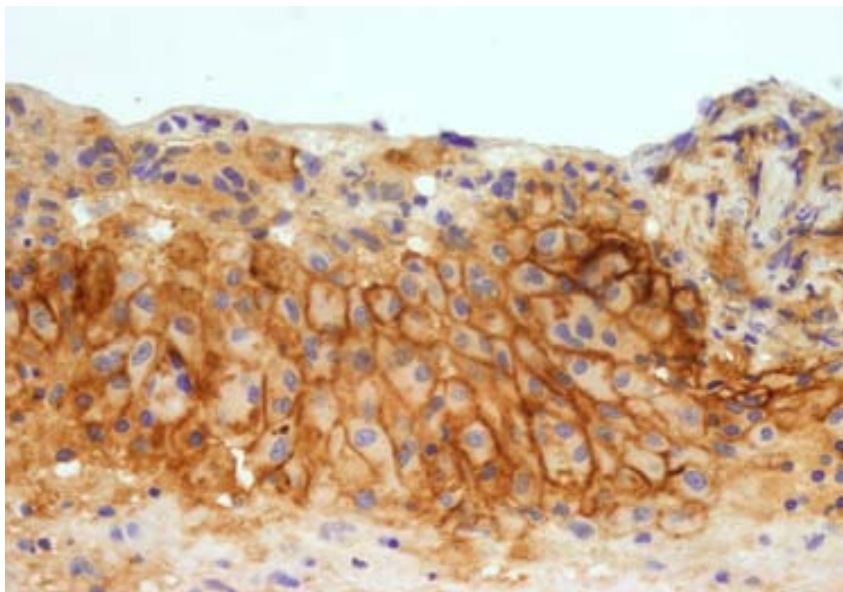
De los 16 pacientes con resultado de PD-L1 positivo analizamos la localización celular de la expresión de PD-L1. En 14 muestras (87.5%) se observó positividad de PD-L1 en la membrana, 16 pacientes (100%) presentaban la tinción positiva en el citoplasma y dos pacientes (12.5%) en el infiltrado inflamatorio.



**Figura 53. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en membrana**



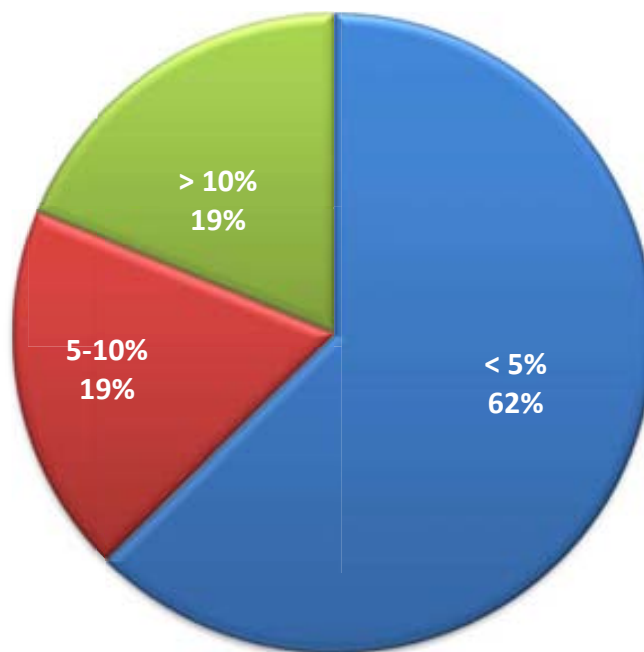
**Figura 54. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en citoplasma**



**Figura 55. Imagen de tinción positiva de PD-L1 en infiltrado inflamatorio**

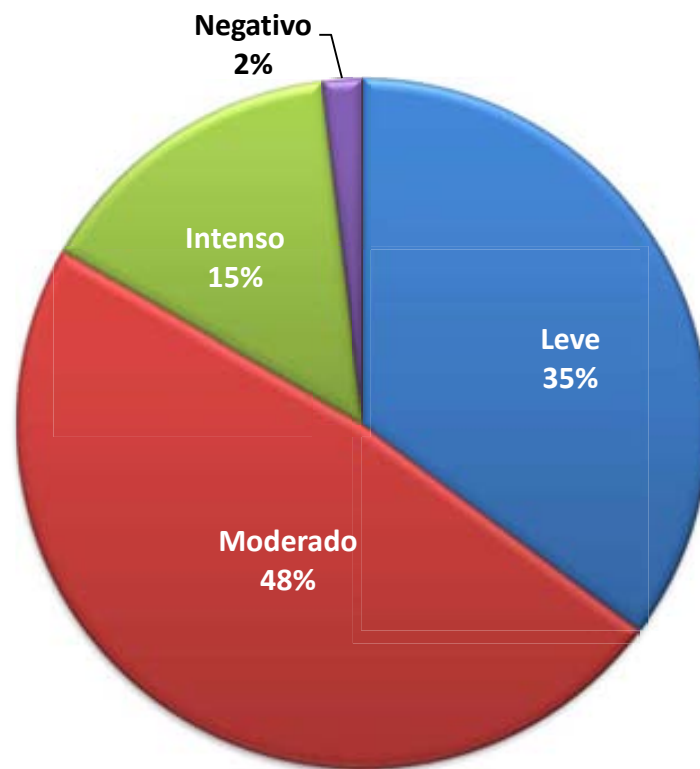


De los 16 pacientes PD-L1 positivos en 10 pacientes (62.5%) era positivo en menos del 5% de células tumorales. En tres pacientes (18.7%) positivo entre 5-10% de las células tumorales y otros tres pacientes (18.7%) en más del 10% de las células tumorales



**Figura 56. Porcentaje celular de positividad de PD-L1**

En 54 pacientes se analizó la presencia de TIL dentro del tumor y encontramos un infiltrado inflamatorio intenso en 8 pacientes (14.8%), moderado en 26 casos (48.1%), y débil en 19 pacientes (35.1%). Sólo un paciente no presentaba infiltrado inflamatorio en el tumor



**Figura 57. Diagrama de distribución de TIL**

**Tabla 12. Principales características clínicas de los pacientes PD-L1 positivos**

Edad	Sexo	Estadio	Histología
54	H	II	Bifásico
73	H	III	Epitelioide
79	M	IV	Bifásico
69	M	III	Bifásico
62	H	IV	Bifásico
67	H	III	Epitelioide
43	H	III	Epitelioide
62	M	IV	Epitelioide
67	H	II	Epitelioide
83	H	III	Bifásico
70	M	IV	Sarcomatoide
60	H	IV	Bifásico
80	H	IV	Sarcomatoide
81	H	II	Epitelioide
74	M	IV	Sarcomatoide
82	H	IV	Epitelioide

#### 4. Asociación de PD-L1 con variables clínicas

En este estudio encontramos que existe una asociación estadísticamente significativa entre la positividad de PD-L1 con la histología. En los pacientes con mesotelioma epitelioide se encontraron 7 de 46 pacientes positivos, mientras que en los no epitelioides era de 9 de 15 ( $p=0.033$ ).

**Tabla 13. Asociación PD-L1 con histología**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Histología	No epitelial	15	9	0.033
	Epitelial	46	7	

No encontramos asociación entre la expresión de PD-L1 con el género. Entre los 43 hombres, 11 casos eran positivos para PD-L1 y entre las 18 mujeres, 5 eran positivas para PD-L1 ( $p=0.98$ ).

**Tabla 14. Asociación PD-L1 con sexo**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Sexo	Hombre	43	11	0.986
	Mujer	18	5	

No se determinó asociación entre la positividad de la expresión de PD-L1 con el estatus de fumador. De los pacientes fumadores activos 5 de 20 eran positivos, en los exfumadores 5 de 13 pacientes eran PD-L1 positivo y los no fumadores 5 de 27 positivos ( $p=0.618$ )



**Tabla 15. Asociación PD-L1 con hábito tabáquico**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Fumador	No	27	5	0.618
	Activo	20	5	
	Exfumador	13	5	

No se observó asociación de PD-L1 y el contacto con el amianto siendo PD-L1 positivo en 5 de 31 personas expuestas al amianto y en 10 de 22 personas no expuestas.

**Tabla 16. Asociación PD-L1 con la exposición al amianto**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Contacto con amianto	No	22	10	0.142
	Si	31	5	

Existe una asociación significativa de la positividad de PD-L1 y el ratio NLR. En los pacientes con ratio  $NLR < 3$  resultaron PD-L1 positivo 3 de 29 pacientes. Los pacientes con  $NLR \geq 3$  eran positivos 13 de 32 ( $p=0.048$ ).

**Tabla 17. Asociación PD-L1 con NLR**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
NLR	<3	29	3	0.048
	$\geq 3$	32	13	

No se observaron diferencias en la expresión de PD-L1 con el estadio clínico. Los pacientes estadio III eran PD-L1 positivo en 5 de 32 pacientes y los estadios IV en 8 de 16 pacientes,  $p=0.26$ .

**Tabla 18. Asociación PD-L1 con estadio clínico**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Estadio	I	2	0	0.269
	II	8	3	
	III	32	5	
	IV	16	8	

No se observó asociación de PD-L1 con la respuesta a la quimioterapia. De los pacientes que hicieron respuesta completa o parcial 4 de 7 eran PD-L1 positivo, de los pacientes con enfermedad estable 2 de 22 eran positivos y de los que progresan 1 de 12 positivo,  $p=0.065$ .

**Tabla 19. Asociación PD-L1 con respuesta a quimioterapia**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Respuesta a la QT	Completa o parcial	7	4	0.065
	Enfermedad estable	22	2	
	Progresión	12	1	
	No evaluable	1	1	

No encontramos diferencias en la expresión de PD-L1 y el infiltrado linfocitario en el tumor. De los pacientes PD-L1 positivo en 4 casos tenían un infiltrado inflamatorio leve, 5 pacientes un infiltrado moderado y 3 un infiltrado intenso,  $p=0.343$ .

**Tabla 20. Asociación PD-L1 con el infiltrado linfocitario**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
Infiltrado de linfocitos en el tumor	0	1	0	0.343
	1	15	4	
	2	21	5	
	3	4	4	

No hay diferencias en la expresión de PD-L1 con la intensidad del infiltrado linfocitario CD8 ni del infiltrado linfocitario CD4,  $p > 0.05$ .

**Tabla 21. Asociación PD-L1 con CD8**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
CD8	$\leq 50$	28	6	0.194
	$> 50$	13	7	

**Tabla 22. Asociación PD-L1 con CD4**

		PDL1		<i>p-valor</i>
		Negativo	Positivo	
CD4	$\leq 50$	23	8	0.968
	$> 50$	18	5	

## 5. Análisis de la expresión de PD-L1 y supervivencia

Al analizar la supervivencia de los pacientes que expresan PD-L1 encontramos que PD-L1 es un factor pronóstico significativo. Los pacientes PD-L1 positivos tenían una supervivencia de 4.7 meses, frente a 16.3 meses los pacientes PD.L1 negativo,  $p=0.012$ .

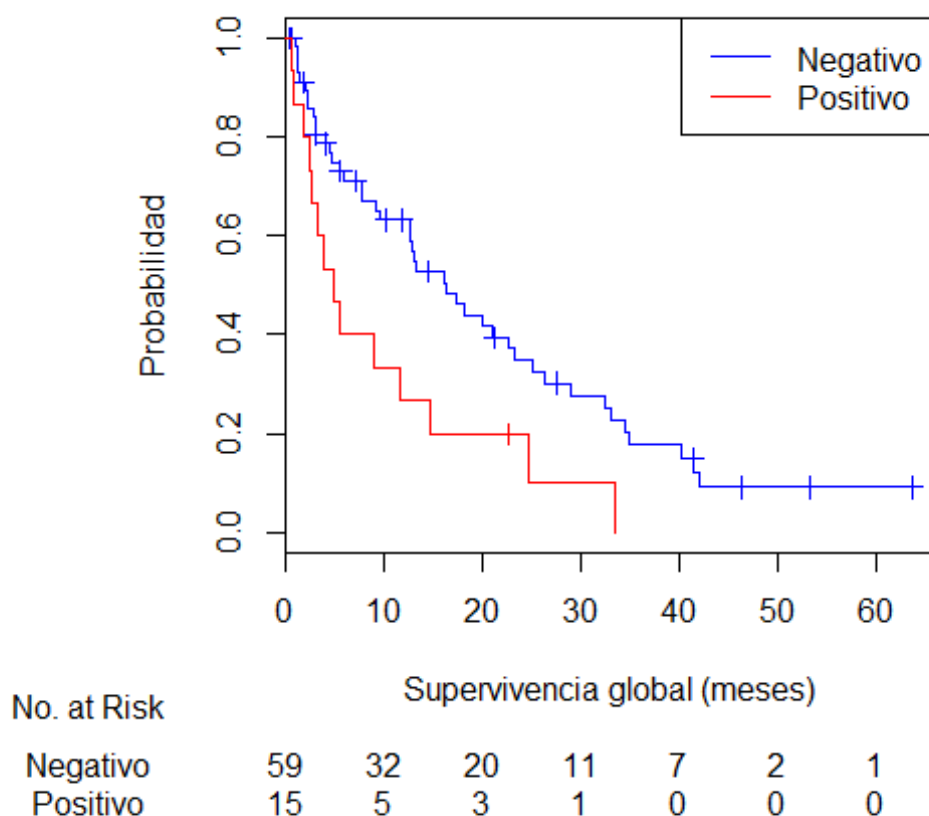
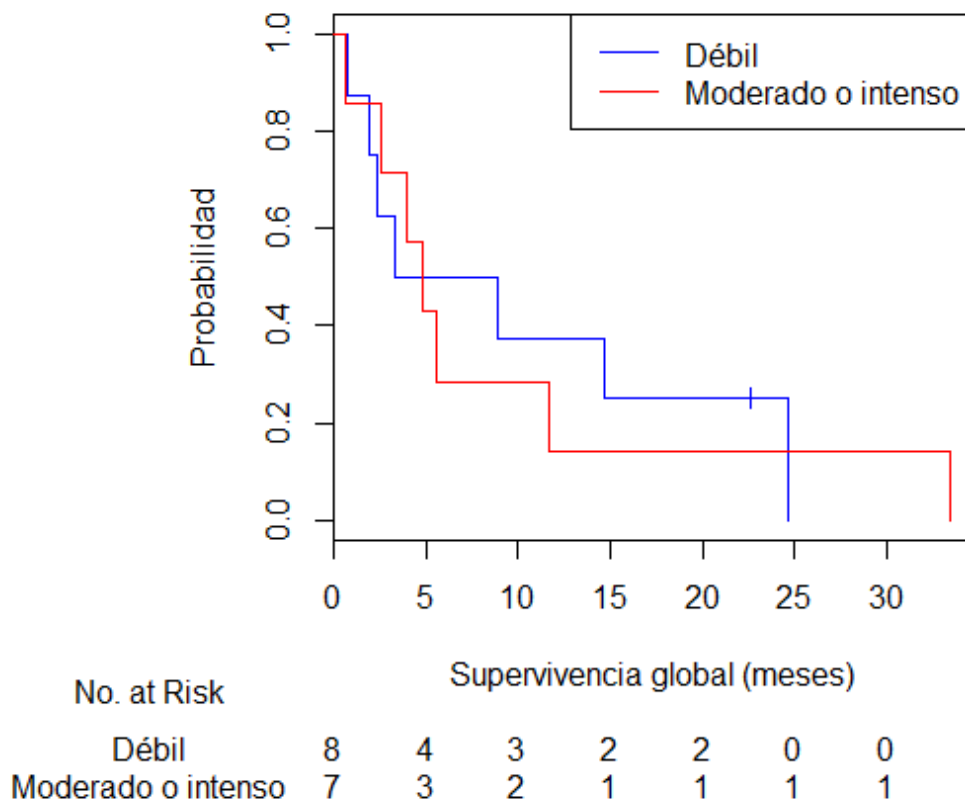


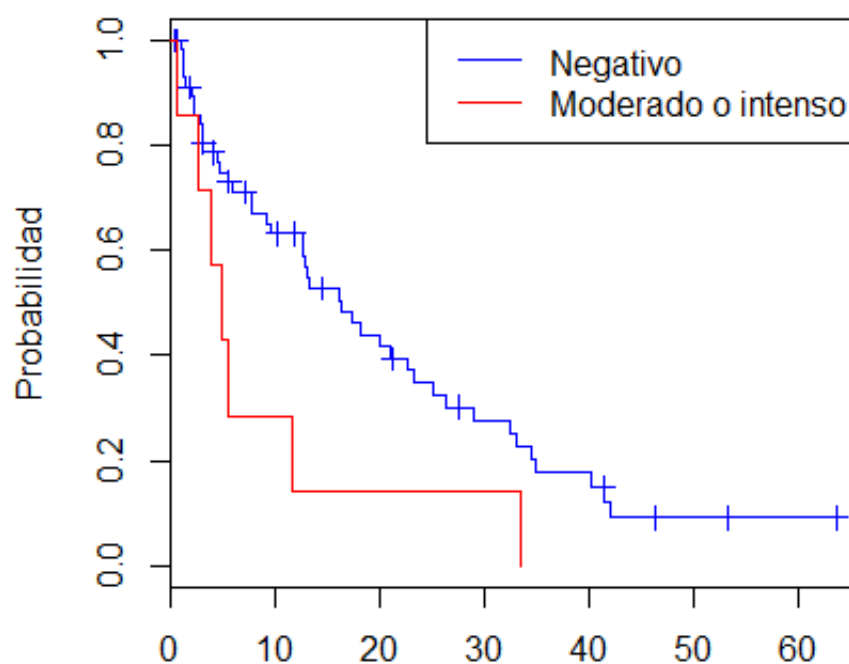
Figura 58. Supervivencia en pacientes PD-L1 positivo y negativo

Al analizar las diferencias en la supervivencia de acuerdo con la intensidad de la expresión de PD-L1 no encontramos diferencias en los pacientes con tinción de PD-L1 positiva débil versus moderado-intenso (6.1 vs 4.7 meses,  $p=0.941$ ).



**Figura 59. Supervivencia según la intensidad de PD-L1 débil/moderada-intensa**

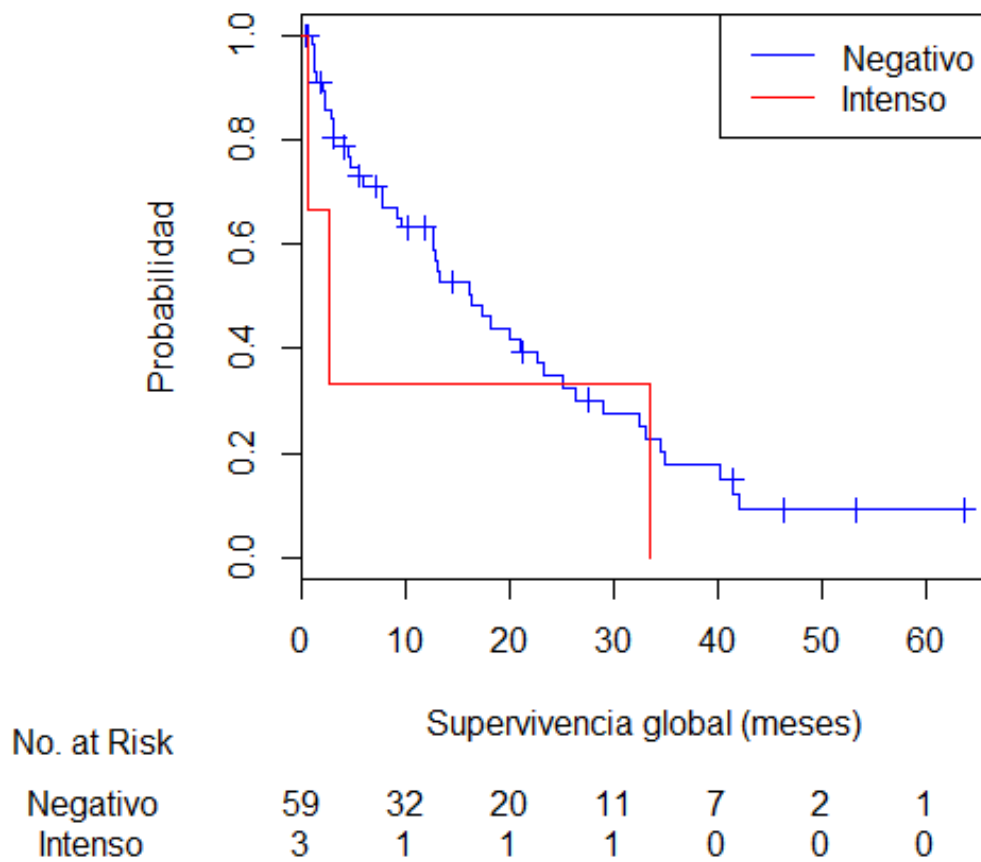
Los pacientes con fuerte expresión de PD-L1 tenían significativamente peor supervivencia que los pacientes PD-L1 negativos. La mediana de supervivencia fue de 4.7 meses en los pacientes con expresión moderada-intensa frente a los 16.3 meses en los pacientes PD-L1 negativos ( $p=0.032$ ).



No. at Risk	Supervivencia global (meses)						
	0	10	20	30	40	50	60
Negativo	59	32	20	11	7	2	1
Moderado o intenso	7	2	1	1	0	0	0

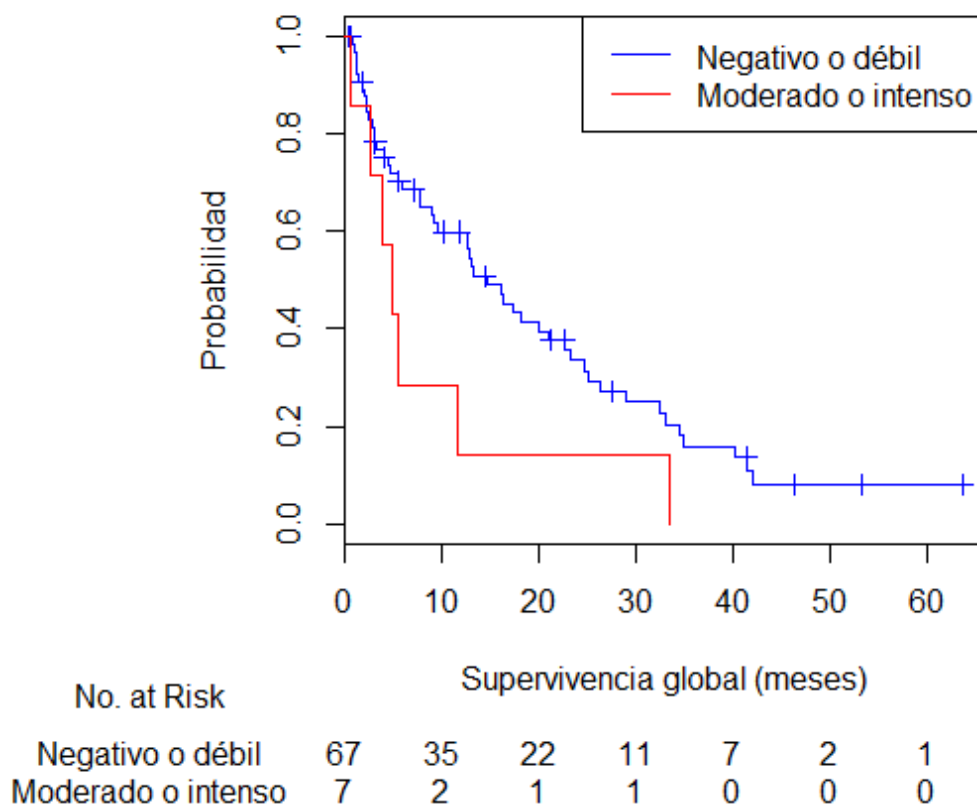
**Figura 60. Supervivencia en los pacientes PD-L1 negativos y moderado-intenso**

No encontramos diferencias en la supervivencia global en los pacientes con expresión negativa de PD-L1 frente a los pacientes con expresión positiva intensa, 16.3 meses en negativo y 2.5 en los positivo intenso,  $p=0.31$ .



**Figura 61. Supervivencia en los pacientes PD-L1 negativos y positivos intenso**

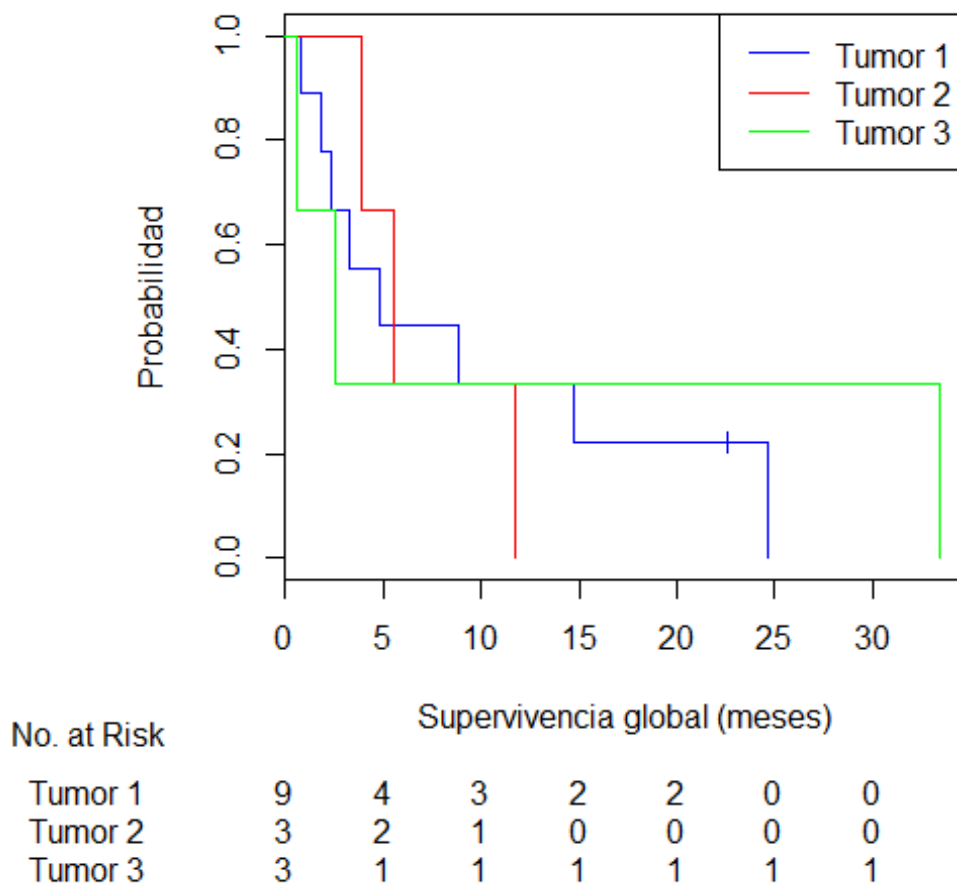
Al analizar las diferencias de supervivencia agrupando los pacientes con expresión PD-L1 negativo o débil frente a los pacientes con expresión positiva moderada o intensa encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los pacientes con tinción negativa tenían una mediana de supervivencia de 14.7 meses frente a los 4.7 meses en los pacientes positivos moderado o intenso ( $p=0.056$ ).



**Figura 62. Supervivencia en los pacientes PD-L1 negativo-débil y positivos moderado-intenso**

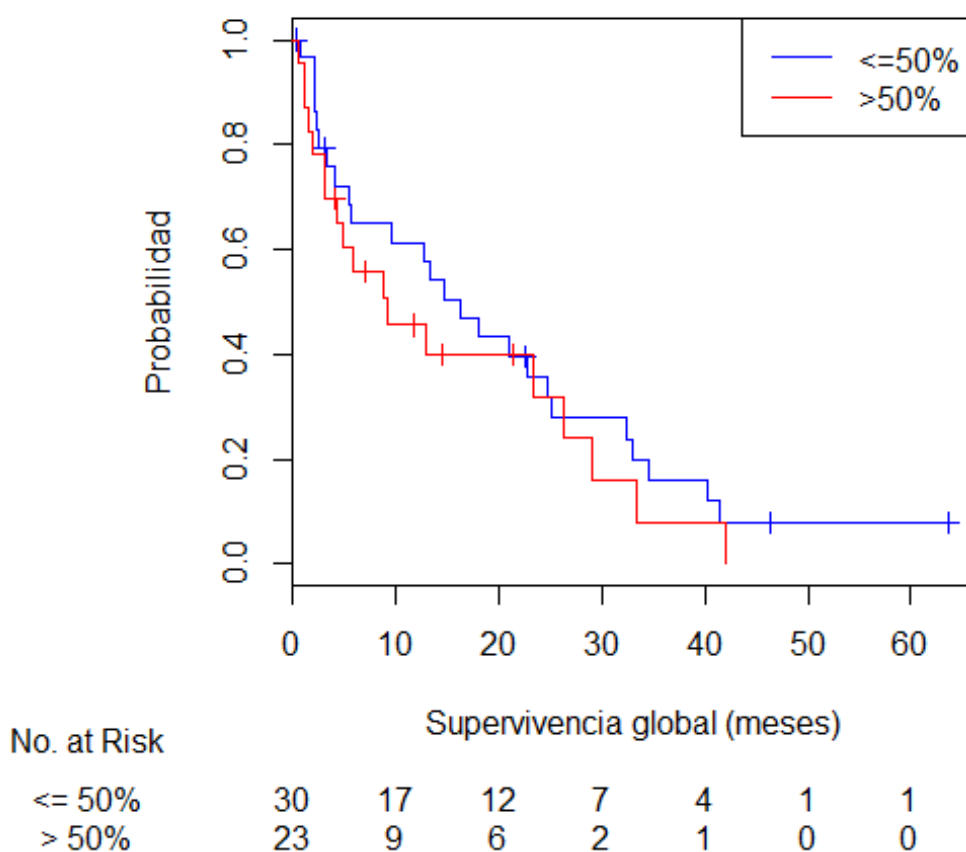


Respecto al porcentaje celular, no encontramos diferencias en la expresión PD-L1 con el porcentaje de células tumorales que lo expresan. La supervivencia de los pacientes PD-L1 en <5% de células tumorales fue de 4.7 meses, en los pacientes con 5-10% de las células tumorales de 5.6 meses y en los que tenían más del 10% de células tumorales de 2.5 meses,  $p=0.93$ .

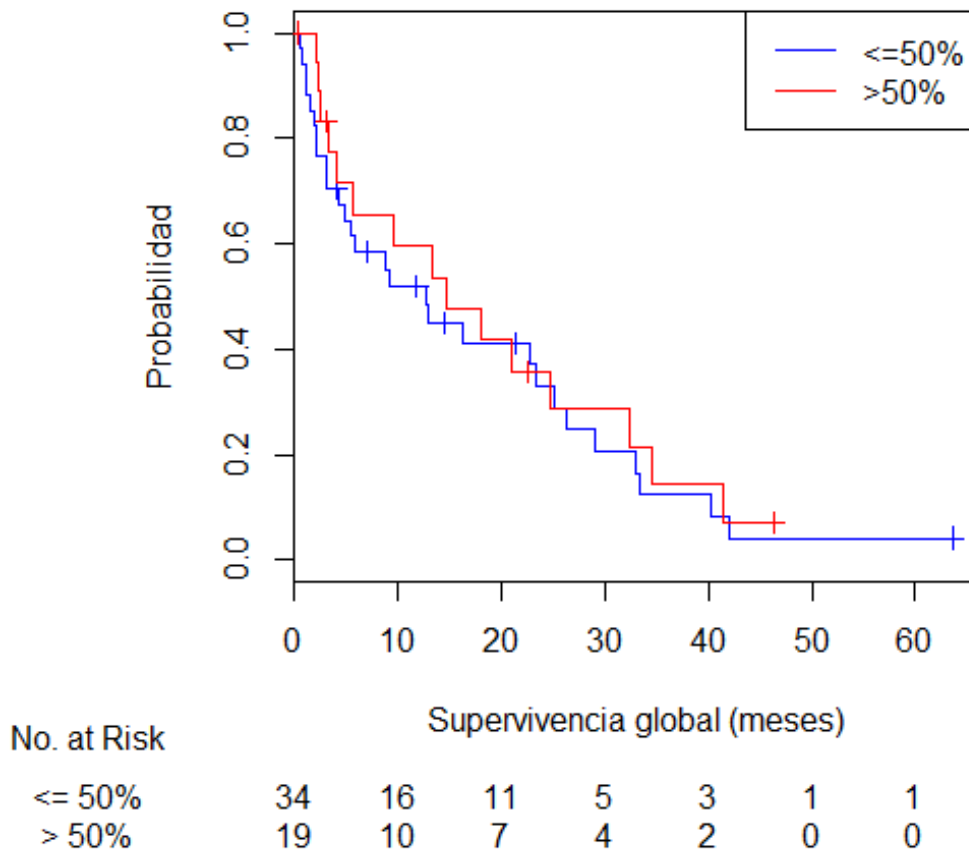


**Figura 63. Supervivencia en los pacientes PD-L1 positivos según el porcentaje celular**

Analizamos las diferencias de supervivencia en función de la presencia de linfocitos CD4 o CD8 infiltrantes en el tumor. Los pacientes con CD4 menor de la media tenían una supervivencia global de 16.2 meses frente a 9.2 meses los pacientes con elevada infiltración de CD4,  $p=0.396$ . Los pacientes con alta infiltración en el tumor de linfocitos CD8 tenían una supervivencia de 14.7 meses frente a 12.7 meses en los pacientes con bajo nivel de infiltración CD8,  $p=0.611$ .



**Figura 64. Supervivencia según el infiltrado CD4**



**Figura 65. Supervivencia según el infiltrado CD8**

En el modelo de regresión de Cox ajustando la supervivencia global con los factores expresión de PD-L1 e histología se demuestra que PD-L1 es un factor pronóstico desfavorable. Ajustado por la histología se mantiene la significación estadística respecto al pronóstico desfavorable.

**Tabla 22. Modelo de regresión de Cox**

	<b>OR IC<sub>95%</sub>(OR)</b>	<b><i>p</i>-valor</b>
<b>Histología (No Epite/Epiteliode )</b>	0.61 (0.34 - 1.09)	0.092
<b>PDL1 (Negativo/Positivo)</b>	2.08 (1.12 – 3.88)	0.021



## **DISCUSIÓN**

---

## V DISCUSIÓN

El MPM es un cáncer poco frecuente que se presenta en estadios avanzados en la mayoría de los casos y pese a las recientes mejoras en el tratamiento sistémico conlleva una escasa supervivencia. A pesar de tener un factor de riesgo para el desarrollo del mesotelioma claramente conocido, el amianto, la detección precoz de los pacientes expuestos al amianto no es posible en la actualidad. Por todo esto se hace necesario establecer nuevas líneas de investigación para conocer la biología y evolución de esta enfermedad y poder así mejorar los tratamientos.

El descubrimiento de la vía de PD1/PD-L1 ha puesto en evidencia que en el desarrollo y crecimiento de los tumores juega un papel importante la desregulación del sistema inmune. El conomando de esta vía en los pacientes con mesotelioma podría repercutir en el desarrollo de nuevos fármacos para estos pacientes.

El presente estudio podría aportar información relevante sobre la utilidad de PD-L1 en los pacientes con mesotelioma. Hemos valorado que PD-L1 se expresa en 20% de nuestra serie, se asocia con determinadas histologías y es un factor pronóstico

### **1. Análisis descriptivo de los pacientes con MPM**

En nuestro estudio la edad media de la población era de 69 años, la mayoría eran hombres (71.4%) y presentaban derrame pleural al diagnóstico. El contacto con el amianto fue un factor de riesgo reconocido por el 44.5% de los pacientes. La mayoría de los casos se presentaban con estadio III-IV, la histología

epitelioides representaba el 65% de los casos y recibieron tratamiento sistémico el 65.5% de los pacientes.

La información sobre datos epidemiológicos de los pacientes con MPM se extrae de los datos de la SEER y del análisis de los ensayos clínicos con mayor número de pacientes.

Como señalamos anteriormente, en un esfuerzo por mejorar el actual sistema de estadificación TNM, la asociación internacional para el estudio del cáncer de pulmón (IASLC) y el grupo internacional para el estudio del mesotelioma (IMIG) han creado una base de datos que recoge información de 3101 pacientes de 15 centros diagnosticados entre 1995 y 2009. La información de esta base está siendo correlacionada con varios factores pronósticos [41]. En esta larga serie de pacientes la edad media es de 63 años, el ratio hombre mujer de 4:1 y el tipo histológico más frecuente es el epitelioides (62% de los casos) seguido del bifásico (16%) y sarcomatoide (8%). Nuestros resultados de las características de los pacientes coinciden con lo publicado. En nuestra serie la edad media de la población era de 69 años, la mayoría eran hombres con un ratio 3:1 frente a las mujeres y por histología el 65% eran epitelioides, seguido de bifásico (5.8%) y sarcomatoide (4.2%). De la comparación de ambos estudios se puede concluir que nuestra población comparte las características clínicas similares a las de estudio de Rusch con más de 3000 pacientes analizados [41].

En el estudio de Vogelzang, comparando cisplatino versus cisplatino y pemetrexed en pacientes con MPM que no habían sido tratados previamente, se incluyeron 456 pacientes, siendo uno de los estudios clínicos que ha incluido mayor número de pacientes [65]. En este estudio la edad media de los pacientes era de 61 años, el 81% de la población eran hombres y el subtipo epitelioides era el más frecuente (68% de los casos). Respecto al estado general de los pacientes, el 51% de ellos presentaban ECOG 1. Nuestros resultados también coinciden con las características clínicas de los pacientes de este estudio.



Se ha reportado que la exposición al asbesto es el factor de riesgo más importante del MPM. El periodo de latencia después de la exposición al asbesto es muy prolongado y persiste por muchas décadas. Los esfuerzos en controlar la exposición al asbesto podrían resultar en un descenso significativo de la incidencia de la enfermedad. En nuestra serie el 44.5% de los pacientes tenían contacto con el amianto, un 31.9% de los casos referían no contacto previo y en un 23.5% de los casos se desconocía el antecedente de exposición al amianto. Nuestros resultados están en congruencia con lo reportado en la literatura. En la base de datos para el análisis inicial del estudio del mesotelioma se reporta que el 48% de los pacientes tenían un contacto previo con el asbesto, en 18% de los casos no había relación con el asbesto y en 30% de los casos se desconocía el antecedente.

Respecto a los síntomas de presentación el mesotelioma se presenta habitualmente con síntomas pulmonares no específicos, como tos, disnea y dolor torácico que condicionan un deterioro del estado funcional. En nuestra serie el 20% de los pacientes estaban totalmente asintomáticos y el 64.8% de los pacientes tenían un ECOG de 1, 10.6% ECOG 2 y 4.2% ECOG 3. En la base de datos retrospectiva del IASLC no se recoge el dato del ECOG de los pacientes. En el estudio de Vogelzang de cisplatino pemetrexed frente a cisplatino el 83.7% de los pacientes presentaban ECOG 0-1, y el 16.4% de los pacientes ECOG 2. Sin embargo hay que interpretar con precaución los datos de este último estudio ya que al tratarse de un ensayo clínico la selección de pacientes puede estar sesgada.

En nuestra serie el 65.5% de los pacientes recibieron tratamiento de quimioterapia sistémica. Hasta la publicación del estudio que compara quimioterapia con cisplatino versus la combinación de cisplatino y pemetrexed en el año 2003 no existía ningún tratamiento estándar de quimioterapia. Este estudio demostró que la combinación de fármacos consigue una mejoría en la

supervivencia de 3 meses (12.1 meses frente a 9.3 meses a favor de la combinación). Sin embargo los pacientes que participaron en este estudio estaban seleccionados siendo la edad media de 61 años y la mayoría de los pacientes estaban paucisintomáticos. En la población de pacientes con mesotelioma con edad avanzada y deterioro del estado general, debido a comorbilidades se desestima el tratamiento sistémico recomendándose únicamente tratamiento sintomático.

## **2. Análisis de factores pronósticos**

Los factores clínicos relevantes para el manejo del mesotelioma incluyen variables epidemiológicas básicas, condiciones clínicas, parámetros comunes del análisis de sangre y estudios de imagen.

En el MPM se han considerado como factores pronósticos más importantes los recogidos por las categorías pronósticas del grupo EORTC y del CALGB [39,40]. El índice del CALGB evalúa las características clínicas que impactan en la supervivencia en 337 pacientes de estudios fase II. En el análisis multivariante, la localización pleural (versus peritoneal o pericárdica), los niveles de LDH mayores de 500U/l, el ECOG deteriorado, la presencia de dolor torácico, plaquetas mayores de 400000, histología no epitelioide y edad mayor de 75 años se consideraron factores pronósticos desfavorables. El grupo EORTC revisó 204 pacientes que participaban en 5 estudios fase II y consideran factores de mal pronóstico el bajo estatus funcional, alto nivel de neutrófilos, género masculino, subtipo sarcomatoide y la certeza del diagnóstico.

En nuestra serie analizamos algunos de estos factores pronósticos. La supervivencia global de nuestra población fue de 13.8 meses, pero los pacientes con histología epitelioide, buen estado funcional y los que responden al tratamiento de quimioterapia presentaban mejores resultados.

En nuestra serie encontramos una mejoría significativa en la supervivencia para los pacientes con histología epitelioide con 16.8 meses, frente a 5.2 meses los pacientes con histología bifásica y 0.8 meses los sarcomatoides ( $p < 0.001$ ). Estos

---

resultados son concordantes por los publicados en la base de pacientes del IASLC para la revisión del TNM de los pacientes con mesotelioma [41]. En esta base se confirmó una clara relación de supervivencia con la histología cuando se consideraron todos los pacientes que se sometieron a algún tipo de cirugía. La mediana de supervivencia para los epitelioides fue de 19 meses frente a 13 meses los bifásicos y 8 meses los sarcomatoides.

Encontramos diferencias de supervivencia en los pacientes de acuerdo a su estado funcional. Los pacientes con ECOG de 0 tenían una mediana de supervivencia de 26.7 meses frente a 16.5 meses los pacientes con ECOG 1, 2.5 meses los pacientes con ECOG 2 y 0.96 meses en pacientes ECOG 3. La escala de ECOG orienta a cuantificar cómo la enfermedad del paciente afecta a su vida diaria y determina el apropiado tratamiento y pronóstico. En las dos principales categorías pronósticas del mesotelioma se ha demostrado que el ECOG deteriorado influye negativamente en el pronóstico [39,40]. La base de factores pronósticos para el futuro TNM del IASLC no recoge el ECOG en su estudio.

En nuestro estudio encontramos diferencias de supervivencia en función de la respuesta al tratamiento de quimioterapia de manera que los pacientes con respuesta parcial tenían una mejor supervivencia que los pacientes que alcanzaron enfermedad estable o progresión (26.6 meses frente a 17.5 meses y 7.8 meses respectivamente,  $p=0.003$ ). En un reciente estudio evaluando la asociación entre la supervivencia y la respuesta al tratamiento de quimioterapia se incluyeron 6 ensayos de la EORTC con un total de 526 pacientes [208]. Concluyen que existe una asociación entre respuesta al tratamiento y supervivencia con una media de 12.8 meses para los pacientes con respuesta parcial, 9.4 meses para los pacientes con estabilización y 3-4 meses para los pacientes con progresión,  $p<0.001$ .

En nuestra serie de pacientes analizada no encontramos diferencias en la supervivencia en función del hábito tabáquico ni en relación al contacto con el

amianto. Aunque la exposición a las fibras de asbesto se ha considerado más un factor de riesgo que pronóstico, se ha sugerido que una mayor duración y mayor intensidad en la exposición al asbesto puede desarrollar tumores más agresivos [209].

No encontramos diferencias en la supervivencia en cuanto a la lateralidad del tumor, de manera que la supervivencia de los pacientes que tenían el tumor a la derecha era de 15.4 meses frente a 21.3 meses los de localización izquierda,  $p=0.832$ .

El TNM en los tumores sólidos se asocia con diferencias en la supervivencia, sin embargo en el mesotelioma no se ha demostrado y en la actualidad se está procediendo a la revisión del TNM. En nuestra serie no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de acuerdo con el estadio TNM. Los pacientes con estadio I tenían una supervivencia global de 40.1 meses, los pacientes estadio II de 16.4 meses, los estadios III de 13.2 meses y los pacientes estadio IV de 13.3 meses,  $p=0.271$ .

No encontramos diferencias en función de la edad. Los pacientes mayores de 75 años alcanzaron una supervivencia de 7.9 meses frente a 17.2 meses los menores de 75 años,  $p=0.407$ . La edad es un potencial factor pronóstico, pero su impacto preciso es difícil de definir. De todas formas, la aparición de un MPM en una persona joven se considera que es resultado de una elevada exposición al asbesto, implicando una enfermedad agresiva. La edad avanzada se considera un buen factor predictivo de supervivencia, con un corte de edad arbitrario que oscila desde los 50 a 70 años [209,210].

Respecto al género tampoco encontramos diferencias de supervivencia en función del sexo con una mediana de supervivencia de 13.5 meses en los hombres frente a 16.8 meses en las mujeres ( $p=0.863$ ). El grupo CALGB sí

considera que el sexo es un factor pronóstico encontrado que el género masculino tiene peor supervivencia que las mujeres [210]. Además los hombres es más probable que tengan una exposición ocupacional con mayor exposición al asbesto que resulta en una enfermedad más agresiva.

Pocos estudios han investigado el valor pronóstico de las células inmunes infiltrantes en MPM y sugieren una correlación entre la infiltración linfoide y prolongada supervivencia [132-134]. Los estudios recientes sugieren que el microambiente del tumor y la interacción entre las células tumorales, células inmunes, células estromales y matriz extracelular son cruciales en la progresión. En el estudio de Anraku con 32 pacientes analizando el impacto de los linfocitos T infiltrantes en la supervivencia de los pacientes con MPM encontraron una clara correlación entre altos niveles de CD8 y supervivencia global. Los altos niveles de CD4 se asociaban con peor supervivencia.

Los TIL se encuentran en el tejido tumoral y la abundancia de TIL se ha correlacionado con buen pronóstico en cáncer de colon, esófago, ovario, y hepatocarcinoma [202-213]. Por el contrario en cáncer renal y cáncer de pulmón los CD8 no se han asociado con supervivencia [214,215]. Los TIL reconocen antígenos específicos del tumor jugando un papel importante en la defensa inmune. En muchos tumores la presencia de TIL y la expresión de complejo HLA clase I se asocia a pronóstico. En el mesotelioma sin embargo, el papel de los TIL no está bien estudiado. En una serie de 44 pacientes se examinó en muestras de parafina el número de TIL CD4 y CD8 contándolos en cinco aéreas independientes con mayor presencia de células inmunoreactivas [134]. No encontraron diferencias significativas ente la supervivencia de acuerdo con la densidad de los CD8 en toda la serie. Cuando limitan el análisis a los 27 pacientes que recibieron tratamiento quirúrgico los pacientes con alta densidad de CD8 presentaban mejor supervivencia respecto a aquellos con baja densidad. En este subgrupo de pacientes operados el pronóstico era mejor para los pacientes con alta densidad de CD4 respeto a los de baja densidad, aunque esto no fue estadísticamente significativo. En nuestra serie evaluamos el impacto

pronóstico del infiltrado linfocitario CD4 y CD8 en 54 pacientes, pero no encontramos asociación entre el tipo de infiltrado y el pronóstico. Los pacientes con altos niveles de CD4 tenían una mediana de supervivencia de 9.2 meses frente a 16.3 meses los pacientes con bajo infiltrado CD4,  $p=0.395$ . En el caso del infiltrado linfocitario predominante CD8 los pacientes con alto infiltrado tenían una supervivencia de 14.7 meses frente a 12.7 meses los pacientes con bajo infiltrado,  $p= 0.611$ .

### **3. Análisis de la expresión de PD-L1**

En nuestra serie analizamos la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica en 77 pacientes que contenían material archivado suficiente para realizar la tinción. Utilizamos el anticuerpo PD-L1 (E1L3N™) XP® de Cell Signaling y medimos su expresión en la membrana de la célula tumoral, el citoplasma y en el infiltrado inflamatorio peritumoral. Encontramos 16 pacientes con resultado positivo para PD-L1, de los cuales 14 casos eran positivos en membrana, 16 en citoplasma y 2 en el infiltrado inflamatorio. Respecto a la intensidad de la tinción en nuestra serie en la mayoría de los casos era débil la tinción. De los casos positivos 10 pacientes presentaban tinción en menos del 5% de células tumorales, 3 pacientes eran positivos entre 5-10% de células tumorales y otros tres pacientes presentaban la tinción positiva en más del 10% de células tumorales.

PD-L1 se expresa de manera constitutiva en las células T y B, macrófagos y células dendríticas y se ha reportado su expresión en tumores de diferentes orígenes incluyendo glioblastoma, cáncer de ovario, renal, cabeza y cuello, colon, melanoma y pulmón [110]. La inmunoterapia ha surgido en oncología como una nueva y excitante clase de tratamiento a partir del descubrimiento de los inhibidores de moléculas co-señaladoras y de inhibidores de PD1 y PD-L1. En los estudios con antiPD1 y anti PD-L1 publicados no se han incluido

pacientes con MPM, pareciendo importante entonces definir si esta vía es significativa en los pacientes con MPM con el potencial de proporcionar mejoras hacia los tratamientos dirigidos a esta vía. Para explorar la prevalencia y el papel de PD-L1 en mesotelioma conducimos un estudio de análisis por inmunohistoquímica con 119 pacientes.

La mayoría de estudios se han realizado en muestras congeladas, por la falta de un anticuerpo apropiado que pueda teñir en especímenes de parafina, lo cual es esencial para el largo seguimiento. En un estudio se examinó la expresión de PD-L1 en parafina en muestras de carcinoma renal usando un original método de recuperación [216]. Sin embargo, el porcentaje de tumores PD-L1 positivos es significativamente más bajo que lo reportado en su estudio previo con muestras congeladas, sugiriendo que su resultado podría no reflejar la expresión de PD-L1.

El anticuerpo más evaluado en los estudios clínicos es el mAb 5H1 y con él se han descrito dos patrones de tinción: membranosa (en la superficie celular) y citoplasmática [217].

En el estudio de Topalian, primer estudio fase I que analizó el efecto de terapias anti PD1 en pacientes con tumores sólidos, de 42 paciente analizados 25 eran positivos para PD-L1 en el análisis de inmunohistoquímica, con el anticuerpo mAb 5H1 [117]. Definieron como positividad la presencia de más de 5% de células tumorales que expresan en la membrana celular PD-L1. De los pacientes positivos 36% tenían respuesta objetiva y ninguno de los 17 pacientes PD-L1 negativo alcanzó respuesta. Este análisis se basó en biopsias opcionales de un subgrupo de pacientes y la hipótesis no fue pre-especificada. Los autores por tanto recomendaban interpretar con precaución estos resultados preliminares.

En la actualidad, los escasos estudios que analizan la presencia de PD-L1 en tumores son muy heterogéneos utilizando diferentes tipos de anticuerpos y definiendo como positivo distintos puntos de corte y diferentes localizaciones dentro del tumor.

**Tabla 24. Anticuerpos para la detección de PD-L1**

Tumor	Referencia	N	Anticuerpo PD-L1	Localización expresión
<b>Cerebrales</b>	[225]	83	BDPharmin gen	ND
<b>Cérvix</b>	[114]	115	5H1	M
<b>Páncreas</b>	[226]	51	MIH	M y C
<b>Urotelial</b>	[227]	65	MIH1	M y C
<b>Gástrico</b>	[228]	102	2H11	C
<b>Esófago</b>	[229]	41	MIH1	M y C
<b>Renal</b>	[216]	306	5H1	M
<b>Pulmón</b>	[230]	52	MIH1	M y C
<b>Pulmón</b>	[231]	109	ND	M y C
<b>Hepatocarcinoma</b>	[218]	240	MIH1	M y C
<b>Melanoma</b>	[224]	150	5H1	M
<b>Ovario</b>	[219]	70	27A2	ND

ND: no disponible, M: membrana; C: citoplasma



En mesoteliomas se ha publicado un solo estudio que analiza la expresión de PD-L1. En el estudio de Currie en líneas celulares de mesotelioma, encuentran que PD-L1 esta ubicuamente expresado en el estroma [147].

En el estudio de Gao y colaboradores con pacientes con hepatocarcinoma analizan la expresión de PD-L1 con el anticuerpo PD-L1 MIHeBioscience y encuentran tinción positiva en la membrana, citoplasma y ambos y con patrón focal o difuso [218]. El estudio de Hamanishi se evalúa la presencia de PD-L1 en pacientes con cáncer de ovario. En este estudio se genera un nuevo anticuerpo contra PD-L1 que reconoce la proteína en muestras de parafina. Evalúan la positividad de la tinción en una escala de 0 a 3 y son negativos 11.4% de los casos, positivo débil 20%, moderado 51.4% e intenso 17.1% [219].

En un estudio con 49 pacientes con carcinoma de Merkel se utilizó el anticuerpo 5H1 y se analizó su expresión en membrana considerando positivo los casos con más de 5% de positividad de la membrana [220]. Además se evaluó el patrón de tinción en el microambiente y encuentran que el 49% de los pacientes eran PD-L1 positivo en las células tumorales y en el 55% de los casos PD-L1 positivo en las células inmune infiltrantes.

En el estudio de Lyford-Pike se analizaron 20 pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello con el anticuerpo mAb 5H1. Encuentran dos patrones de distribución de PD-L1, membranoso y citoplasmático. De los 20 casos analizados 14 eran PD-L1 positivos y en los 14 casos aparecía la tinción en ambas localizaciones [221].

#### **4. Asociación de PD-L1 con variables clínicas**

En nuestra serie analizamos la asociación de la expresión de PD-L1 con variables de interés. Investigamos si existía asociación de PD-L1 con la histología, género, hábito tabáquico, contacto con el amianto, ratio NLR, estadio TNM, respuesta a la quimioterapia y presencia de infiltrado linfocitario en el tumor. Las únicas variables que se asociaron de manera significativa con positividad de PD-L1 fueron la histología y el ratio NLR.

Encontramos una asociación positiva entre la expresión de PD-L1 con la histología de manera que los pacientes con tipo no epitelial con mayor frecuencia presentaban positividad de PD-L1 ( $p=0.033$ ). Los pacientes con ratio NLR  $\geq 3$  era más probable que tuvieran PD-L1 positivo ( $p=0.048$ )

Una asociación entre la positividad de la expresión de PD-L1 y la agresividad del tumor y características de mal pronóstico ha sido evaluada por otros autores. En cáncer de mama, Muenst y colaboradores, reportaron que la expresión de PD-L1 se asociaba con una variedad de características adversas como mayor grado, receptor de estrógenos negativos y aumento de infiltración de las células T [222].

En el estudio llevado a cabo por Gao se evaluó si la sobreexpresión de PD-L1 se asociaba con agresividad y recurrencia postoperatoria en 240 pacientes con hepatocarcinoma [218]. Los autores analizan la expresión de PD-L1 en función de la edad, género, historia de hepatitis, positividad de alfa fetoproteína, cirrosis, tumor encapsulado, multiplicidad y diferenciación del tumor, invasión vascular, estadio TNM, tratamiento adyuvante y tratamiento postrecurrencia.

De todas estas variables analizadas encuentran que sólo la presencia de invasión vascular se asocia de manera significativa con la positividad de PD-L1.

En cáncer de ovario analizan si la expresión de PD-L1 se asocia con variables clínicas como la edad, el estatus del tumor primario, las metástasis ganglionares, las metástasis a distancia, el tipo histológico, el estatus del tumor residual y la quimioterapia [219]. Ninguna de las variables se asoció con la positividad de PD-L1.

En tumores de Merkel se analizó la expresión de PD-L1 tanto en el tumor como en el infiltrado y no se correlacionó la tinción con características clínicas como edad, género ni estadio patológico al diagnóstico [220].

En un estudio de cáncer de pulmón Velcheti evaluó la expresión de la proteína PD-L1 usando técnicas de inmunofluorescencia [223]. Estudiaron 237 pacientes y analizaron la expresión de PD-L1 según las variables clínicas edad, género, histología, hábito tabáquico, estadio y la presencia de inflamación. Encuentran una asociación estadísticamente significativa de PD-L1 con el estadio TNM, la histología y el infiltrado linfocitario.

## **5. Análisis de la expresión de PD-L1 y supervivencia**

Analizamos la diferencia de supervivencia en nuestra serie entre los pacientes con PD-L1 positivo versus los negativos. Encontramos una diferencia estadísticamente significativa para supervivencia de acuerdo con la expresión de PD-L1. Los pacientes con PD-L1 positivo (tinción débil, moderada o intensa) tenían una mediana de supervivencia de 4.7 meses frente a 16.33 meses los negativos ( $p=0.012$ ).

Analizamos posteriormente si existen diferencias en la supervivencia de acuerdo con la intensidad de la tinción. Cuando comparamos la positividad débil frente a moderada no encontramos diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo al comparar los pacientes con resultado negativo frente a los positivos moderado e intenso sí encontramos diferencias estadísticamente significativas, con una diferencia de 4.7 a 16.33 meses de supervivencia a favor de la ausencia de expresión ( $p=0.032$ ). Cuando comparamos por último la diferencia de supervivencia entre los pacientes sin tinción de PD-L1 y los positivo intenso no encontramos diferencias estadísticamente significativa aunque sí una tendencia, 16.3 meses versus 2.5 meses los negativo ( $p=0.311$ ).

Finalmente analizamos si existen diferencias de supervivencia en los pacientes en función del porcentaje de células tumorales. Los pacientes con una positividad en más del 10% de las células tumorales tenían una mediana de supervivencia de 2.56 meses, frente a 5.57 meses los pacientes con positividad en 5-10% de las células tumorales y 4.79 meses lo de menos de 5% de células, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0.939$ ).

La mayoría de los grandes estudios retrospectivos demuestran que la expresión de PD-L1 se correlaciona con mal pronóstico y una enfermedad más agresiva, pero algunos estudios indican una falta de asociación o incluso que se asocia con mejor supervivencia [114,115,224 ].

**Tabla 25. Estudios de análisis pronóstico de PD-L1 en tumores sólidos**

Tumor	Referencia	N	Pronóstico PD-L1+
<b>Cerebrales</b>	[225]	83	ND
<b>Cérvix</b>	[114]	115	No pronóstico
<b>Páncreas</b>	[226]	51	Peor pronóstico
<b>Urotelial</b>	[227]	65	Peor pronóstico
<b>Gástrico</b>	[228]	102	Peor pronóstico
<b>Esófago</b>	[229]	41	Peor pronóstico
<b>Renal</b>	[216]	306	Peor pronóstico
<b>Pulmón</b>	[230]	52	No pronóstico
<b>Pulmón</b>	[231]	109	Peor pronóstico
<b>Hepatocarcinoma</b>	[218]	240	Peor pronóstico
<b>Melanoma</b>	[224]	150	Mejor pronóstico
<b>Ovario</b>	[219]	70	Peor pronóstico

ND: no disponible

Aunque hay razones biológicas para explicar los resultados discrepantes, las revisiones de la literatura que correlacionan expresión de PD-L1 con pronóstico deberían interpretarse con precaución, por la heterogeneidad en la expresión dentro del tejido tumoral, la medida en membrana más que la proteína intracelular o mRNA, la ausencia de anticuerpos específicos comerciales y la dificultad sustancial en los métodos de detección de PD-L1 en parafina. La proteína PD-L1 contiene sólo dos pequeñas regiones lineales hidrofílicas, y por tanto un número limitado de unión de anticuerpos.

En cáncer de pulmón los datos de la prevalencia y el pronóstico de PD-L1 son datos limitados. Los resultados de estos pequeños estudios son mixtos con algunos demostrando peor pronóstico y otros no diferencia en el pronóstico [115,231,232].

El estudio de Ohigashi se demostró que la expresión de PD-L1 o de PD-L2 es un marcador pronóstico postoperatorio en pacientes con cáncer de esófago [229].

En un estudio analizando la expresión de PD-L1 en hepatocarcinomas los pacientes con expresión positiva de PD-L1 tenían peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global que los pacientes negativos [218]. La mediana de supervivencia libre de enfermedad fue de 14.9 meses en los pacientes PD-L1 positivo frente a no alcanzada en los PD-L1 negativos. La mediana de supervivencia fue de 29.6 meses en los pacientes PD-L1 positivo frente a 59.4 meses en los pacientes negativos, confirmándose su valor pronóstico en el análisis multivariante.

En el estudio de pacientes con cáncer de ovario la positividad de PD-L1 se asocia con peor pronóstico [219]. La tasa de supervivencia a 5 años fue del 80% para los PD-L1 bajos versus 52.6% para los PD-L1 altos (tinciones moderada e intensa).

En un estudio con tumores de Merkel encuentran una correlación entre la supervivencia y la expresión de PD-L1 en 49 pacientes analizados [220].

En un estudio de pacientes con cáncer de pulmón la expresión de PD-L1 se asoció con supervivencia [223]. La mediana de supervivencia fue significativamente mejor en los pacientes PD-L1 positivo. En este estudio la mayoría de los pacientes eran I y II.

## **6. Limitaciones del estudio**

El objetivo de este estudio es analizar la expresión de PD-L1 en una serie de pacientes con MPM y evaluar su relevancia. Aquí demostramos que la expresión de PD-L1 ocurre en un 20% de los pacientes.

La posibilidad de analizar PD-L1 se encuentra muy limitada por la ausencia de un anticuerpo comercial validado. En nuestro estudio evaluamos la expresión de un nuevo anticuerpo anti PD-L1 experimental que no está aun comercialmente disponible.

Mostramos la expresión de PD-L1 en un 20% de los pacientes. Nosotros usamos la positividad de PD-L1 en más del 1% de células tumorales como punto de corte para clasificar los tumores como positivos o negativos. Este punto de corte ha sido usado en publicaciones previas. Sin embargo el anticuerpo de nuestro estudio es diferente de los publicados. El anticuerpo más evaluado en los estudios es el 5H1 y se define como positividad la presencia de PD-L1 en un 5% de células tumorales. Sin embargo los umbrales de validación no han sido claramente definidos y la reproducibilidad no se ha medido formalmente. La mayoría de estudios han usado una estimación visual subjetiva de los niveles de la estimación de PD-L1 y este punto de corte ha sido asociado con respuestas clínicas a tratamiento anti PD-1.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es el tamaño de la muestra. El MPM es un tumor poco frecuente y la realización de varios marcadores de inmunohistoquímica para establecer el diagnóstico agota en numerosas ocasiones el material obtenido en la biopsia. Nuestro estudio sólo incluye muestras recogidas de manera retrospectiva.

## **CONCLUSIONES**

---



## VII CONCLUSIONES

1. PD-L1 es un marcador que se puede analizar por inmunohistoquímica en el mesotelioma pleural maligno.
2. PD-L1 se expresa en 20% de los pacientes con mesotelioma.
3. PD-L1 se asocia a histología no epitelioide
4. PD-L1 es un factor pronóstico desfavorable en los pacientes con MPM.
5. Se propone analizar PD-L1 a los pacientes con MPM para conocer su pronóstico y valorar la posibilidad de tratamiento dirigido

## **BIBLIOGRAFIA**

---

## VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Carbone M, Abelda S, Broaddus VC, et al: Eight International Interest Group Meeting (IMIG). *Oncogene* 2007; 26: 6959
2. Teta MJ, Mink PJ, Lau E, et al. US mesothelioma patterns 1973-2002: indicators of change and insights into background rates. *Eur J Cancer Prev* 2008; 17:525.
3. Price B. Analysis of current trends in United States mesothelioma incidence. *Am J Epidemiol* 1997; 145:211.
4. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, et al. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer* 2005; 92:587.
5. Robinson BM. Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann Cardiothorac Surg* 2012; 1:491
6. Ismail-Khan R, Robinson LA, Williams CC Jr, et al. Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer Control* 2006;13(4):255–263
7. López-Abente G, García-Gómez M, Menéndez-Navarro A, et al. Pleural cancer mortality in Spain: time-trends and updating of predictions up to 2020. *BMC Cancer* 2013,13:528
8. Grupo de Estudio del mesotelioma en Barcelona (GEMEBA). Mortalidad por mesotelioma pleural en la provincia de Barcelona. *Med Clin (Barc)* 1993; 101: 565-569
9. SEER Cancer Statistics Review 1975-2007 National Cancer Institute. SEER.cancer.gov
10. Mesothelioma Incidence statistics. Cancer Research UK. [www.cancerresearchuk.gov](http://www.cancerresearchuk.gov)
11. Robinson, B. W. and R. A. Lake. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med* 2005;353(15): 1591-1603
12. Selikoff IJ, Hammond EC, Seidman H. Latency of asbestos disease among insulation workers in the United States and Canada. *Cancer* 1980;46:2736
13. Metintas M, Ozdemir N, Hillerdal G, et al. Environmental asbestos exposure and malignant pleural mesothelioma. *Respir Med* 1999;93:349,
14. Bayram M, Dongel I Bakan ND, et al. High risk of malignant pleural mesothelioma and pleural plaques in subjects born close to ophiolites. *Chest* 2013;143:164-71
15. Wagner, J. C., C. A. Sleggs, et al. "Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in North Western Cape Province." *Brit J Indust Med* 1960; 17: 260-271.
16. Selikoff, I. J., J. Churg, et al. Asbestos Exposure and Neoplasia. *JAMA* 1964;188: 22-26.
17. Selikoff, I. J., J. Churg, et al. Relation between Exposure to Asbestos and Mesothelioma." *N Engl J Med* 1965; 272(11): 560-565.
18. Carbone M, Kratzke RA, Testa JR. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002;29:2

19. Altomare DA, Vaslet CA, Skele KI et al. A mouse model recapitulating molecular features of human mesotelioma. *Cancer res* 2005;65:8090
20. Yang H, Bocchetta M, Krocynska B, et al. TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced citotoxicity via NF-kappa-B dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:10397
21. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis* 2013;34:1413-1419
22. Gazdar, A. F. and M. Carbone. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma and its relationship to simian virus 40. *Clin Lung Cancer* 2003; 5(3): 177-181.
23. Tward JD, Wendland MM, Shrieve DC, et al. The risk of secondary malignancies over 30 years after the treatment of non-Hodgking lymphoma. *Cancer* 2006;107:108
24. Musti M, Kettunen E, Dragonieri S, et al. Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genetic Cytogenet*, 170:9-15
25. Takeda M, et al. Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by FISH analysis on paraffin-embedded tissues. *J Clin Pathol* 2013;139:39-46
26. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T et al. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2011, 71;873-883
27. Carbone M, Yang H, Pass H, , et al. BAP 1 and cancer. *Nat REv Cancer* 2013;13:153
28. Carbone M, Ferris LK, Baumann F, et al. BAP1 cancer síndrome: malignant mesotelioma, uveal and cutaneous melanoma and MBAITs. *J Trasnl Med* 2012;10:179
29. Carbone M, Emri S, Doagn AU et al. A mesothelioma epidemic in Capadoccia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat Rev Cancer* 2007;7:147
30. Hammar SP, Henderson DW, Klebe S, Dodson RF. Neoplasms of the pleura. In: Tomaszefski JF Jr. (editor): Dail and Hammar's pulmonary pathology: volume II neoplastic lung disease, 3rd ed. New York: Springer; 558-734
31. Erasmus J Truong T, Smythe W et al. Integrated computed-tomography positron emission tomography in patients with potentially resectable MPM: staging implication. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1364
32. Plathow C, Staab A, Scmaehl A, et al. Computed tomography, positron emission tomography, positron emission tomography/computed tomography, and magnetic resonance imaging for staging of limited pleural mesothelioma: initial results. *Invest Radiol* 2008;43:737
33. Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med* 2012; 367:1417.
34. O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006; nnn 66
35. Chang K, Pai LH, Pass H, et al. Monoclonal antibody K1 reacts with epithelial mesothelioma but not with lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:259
36. Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J, et al. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012; 30:1541.
37. Pass HI, Lott D, Lonardo F, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 2005; 353:1564.
38. AJCC Cancer Staging Manual 7<sup>th</sup> edition 2010. American Joint Committee on Cancer

39. Herndon JE, Green NR, Chahinian AP, et al. Factors predictive of survival among 337 patients with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the Cancer and Leukemia Group B. *Chest* 1998;113:723
40. Curran D, Sahmoud T, Therasse P. et al. prognostic factors in patients with pleural mesothelioma: the European Organization for Research and Treatment of Cancer experience. *J Clin Oncol* 1998;16:145
41. Rusch V. A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma. From the International Mesothelioma Interest Group. *Chest* 1995;108:122-1228
42. Kao SC, Pavlakis N, Harvie R, et al. High blood neutrophil to-lymphocyte ratio is an indicator of poor prognosis in malignant mesothelioma patients undergoing systemic therapy. *Clin Cancer Res.* 2010;16:5805-13.
43. Hodgson J, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg.* 2000;44:565-601
44. Ambrogi V, Baldi A, Schillaci O, Mineo TC. Clinical impact of extrapleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:1692-99.
45. Rusch VW, Giroux D, Kennedy C, et al. Initial analysis of the international association for the study of lung cancer mesothelioma database. *J thorac Oncol* 2012;7:1631
46. Flores R, Akhurst T, Gonen M, et al. Positron emission tomography predicts survival in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:763
47. Gordon GJ, Rockwell G, Jensen R, Hsiao L, et al. Using gene expression ratios to predict outcome among patients with mesothelioma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:598
48. Pass H, Liu Z, Wall A et al. Gene expression profile predict survival and progression of pleural mesothelioma. *Clin cancer res* 2005;11:4406
49. Zimling ZG, Sørensen JB, Gerds TA, et al. Low ERCC1 expression in malignant pleural mesotheliomas treated with cisplatin and vinorelbine predicts prolonged progression-free survival. *J Thorac Oncol.* 2012;7:249-56.
50. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:10397-402.
51. Edwards JG, Faux SP, Plummer SM, et al. Cyclooxygenase-2 expression is a novel prognostic factor in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2002;8:1857-62
52. Edwards JG, Swinson DE, Jones JL, et al. EGFR expression: associations with outcome and clinicopathological variables in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2006;54:399-407.
53. Demirag F, Unsal E, Yilmaz A, Caglar A. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis, and mitotic activity index in malignant pleural mesothelioma. *Chest.* 2005;128:3382-7
54. Mazieres J, You L, He B, et al. Wnt2 as a new therapeutic target in malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer.* 2005;117:326-32.
55. Yokoyama T, Osada H, Murakami H, et al. YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis.* 2008;29:2139-46
56. Hopkins-Donaldson S, Belyanskaya LL, Simões-Wüst AP, et al. p53-induced apoptosis occurs in the absence of p14(ARF) in malignant pleural mesothelioma. *Neoplasia.* 2006;8:551-9.
57. Gordon GJ, Mani M, Mukhopadhyay L, et al. Expression patterns of inhibitor of apoptosis proteins in malignant pleural mesothelioma. *J Pathol.* 2007;211:447-54.

58. Opitz I, Soltermann A, Abaecherli M, et al. PTEN expression is a strong predictor of survival in mesothelioma patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33:502-6
59. Villa R, Daidone MG, Motta R, et al. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist and differentially affect clinical outcome in diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4134-40
60. Kao SC, Klebe S, Henderson DW, et al. Low calretinin expression and high neutrophil-to-lymphocyte ratio are poor prognostic factors in patients with malignant mesothelioma undergoing extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Oncol*. 2011;6:1923-9.
61. Ducko, C. T. and D. J. Sugarbaker. Pleural Tumors. *Pearson's Thoracic & Esophageal Surgery*. 2008;1121-1136
62. Rice, D. C., C. W. Stevens, et al. Outcomes after extrapleural pneumonectomy and intensity-modulated radiation therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Thorac Surg* 2007; 84(5): 1685-1692.
63. Treasure T, Lang-Lazdunski L, Waller D, et al. Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleural mesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomized feasibility study. *Lancet Oncol* 2011;12:763-772
64. Flores RM, Pass HI, Seshan V. Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: results in 663 patients. *J Thorac Cardiovas Surg* 2008;135:620
65. Vogelzang, N. J. Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. "Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma." *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21(14): 2636-2644
66. Ceresoli G, Zucali P, Favaretto A, et al. Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2006;24:1443
67. Castagneto B, Botta M, Aitini E, et al. Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Oncol* 2008;19:370
68. Van Meerbeeck J, Gaafar R, Manegold C, et al. Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada. *J Clin Oncol* 2005;23:6881
69. Obasaju C, Ye Z, Wozniak A, et al. Single-arm, open label study of pemetrexed plus cisplatin in chemotherapy naïve patients with malignant pleural mesothelioma: outcomes of an expanded access program. *Lung cancer* 2007;55:187-194
70. Santoro A, O'Brien M, Stahel R, et al. Pemetrexed plus cisplatin versus pemetrexed plus carboplatin for chemotherapy naïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the International Expanded Access Program. *J Thorac Oncol* 2008;3:756-763
71. Hillerdal G, Sorensen J, Sundstrom S, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma with carboplatin, liposomized doxorubicin and gemcitabine: a phase II study. *J Thorac Oncol* 2008;3:1325-1331
72. NCCN guidelines version 1.2014. Malignant pleural mesothelioma. [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
73. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674

74. Yao S, Zhu Y and Chen L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov*, 2013;12:130-146
75. Coussens, Lisa M, en Zena Werb. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-867.
76. Colotta, Francesco, Paola Allavena, Antonio Sica, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-1081.
77. Mantovani A, Allavena, Sica A, et al Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454:436-444.
78. Pai S, Lin Y, Macaes B, et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gen therapy* 2006; 13:464-477
79. Baecher-Allan, Clare M, David A Hafler. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 2005;117: 192-193
80. Larmonier N, Marilyn N, Marron, et al. Tumor-derived CD4(+)/CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007; 48-59.
81. Ormandy L, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 2005; 65: 2457-2464.
82. Jonuleit, H, E Schmitt, G Schuler, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2000; 192: 1213-1222.
83. Apostolou I, Verginis P, Kretschmer K, et al. Peripherally induced Treg: mode, stability, and role in specific tolerance. *Journal of Clinical Immunology* 2008;28:619-624.
84. DeLong P, Carrol R, Henry A, et al. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 2005;4:342-346.
85. Malek T and Bayer A. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2 . *Nature Reviews Immunology* 2004;4:665-674
86. Hussein MR. Tumor-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis an insight. *Br J Dermatol* 2005;153:18-21
87. Pfizenmaier K, Scheurich P, Schluter C, et al. Tumor necrosis factor enhances HLA-A,B,C and HLA-DR gene expression in human tumor cells. *J Immunol* 1987;138:975-980.
88. Cohen PJ, Lotze MT, Roberts JR, et al. The immunopathology of sequential tumor biopsies in patients treated with interleukin-2. Correlation of response with T-cell infiltration and HLA-DR expression. *Am J Pathol* 1987;129:208-216
89. Belldegrun A, Muul LM, Rosenberg SA. Interleukin 2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: isolation, characterization, and antitumor activity. *Cancer Res* 1988;48:206-214
90. Rosenberg SA, Packard BS, Aebbersold PM, et al. Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1988;319:1676-1680.
91. Pages, F. Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005: 353, 2654–2666 (2005).

92. Galon, J, Costes A, Sanchez-Cabo F, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313, 1960–1964
93. Azimi, F, Scolyer R, Rumcheva P, *et al.* Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2012;30, 2678–2683
94. Kreike, B, Kouwenhove M, Horlings H. *et al.* Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2007;9, R65
95. Mahmoud, S.M, Paish E, Powe D *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol* 2011;29, 1949–1955.
96. Zhang, L, Conejo-Garcia J, Katsaros D *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med* 2003. 348, 203–213
97. Rusakiewicz, S, Semeraro M, Sarabi M, *et al.* Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*.2013 73, 3499–3510 .
98. Bui, J.D. and Schreiber, R.D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr. Opin. Immunol* 2007;19:203–208
99. Pufnock, J.S. and Rothstein, J.L. Oncoprotein signaling mediates tumor-specific inflammation and enhances tumor progression. *J. Immunol* 2009;182:5498–5506
100. Russell, J.P, Shinohara S, Melillo R. *et al.* Tyrosine kinase oncoprotein, RET/PTC3, induces the secretion of myeloid growth and chemotactic factors. *Oncogene* 2003;22: 4569–4577
101. Gajewski T, Schreiber H, Fu Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 2013;14:1014-1022
102. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11:3887–95.
103. Pardoll D. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Review Cancer* 2012, 252-264
104. Rudd C and Schenider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signaling. *Nature review Immunology* 2003;3:544-556
105. Garber K. Industry makes strides in melanoma. *Nature biotechnology.* 2010;763-764
106. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:336–47.
107. Keir ME, Liang SC, Guleria I, *et al.* Tissue expression of B7-H1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 2006;203:883–95.
108. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, *et al.* PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704.
109. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001;2:261–8.



110. Dong H, Strome SE, Matteson EL, et al. Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 2003;111:363–70.
111. Kuipers H, Muskens F, Willart M, et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4 $\beta$  T cell activation. *Eur J Immunol* 2006; 36:2472–82.
112. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480:480-489
113. Wherry EJ. T-cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011;12:492–9.
114. Karim R, Jordanova ES, Piersma SJ, et al. Tumor-expressed B7-H1 and B7-DC in relation to PD-1 $\beta$  T-cell infiltration and survival of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:6341–7.
115. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M. B7-H1 expression on non small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:5094–100.
116. Thompson, R. H., H. Dong, C. M. Lohse, B. C. et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007;13: 1757–1761.
117. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443–54.
118. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8:793-800.
119. Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of B7-H1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 2006;119:317–27.
120. Wong RM, Scotland RR, Lau RL, et al. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen-specific CTLs. *Int Immunol* 2007;19:1223–34.
121. Zhang Y, Huang S, Gong D, et al. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8 $\beta$  T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol* 2010;7:389–95.
122. Patnaik A, Kang SP, Tolcher AW, et al. Phase I study of MK-3475 (anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr 2512).
123. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013; 369:134.
124. Garon E, Balmanoukian A, Hamid O et al. Preliminary clinical safety and activity of MK-3475 monotherapy for the treatment of previously treated patients with non-small cell lung cancer. Presented at: IASLC 15th World Conference on Lung Cancer; October 2013; Sydney, Australia. MO18.02.
125. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 2008;14:3044–51.

126. Spigel D, Gettinger S, Horn L et al. Clinical activity, safety, and biomarkers of MPDL3280A, an engineered PD-L1 antibody in patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). ASCO Meeting Abstracts 31, 8008 (2013). ASCO 2013.
127. Haile S, Dalal S, Clements D, et al. Soluble CD80 restores T cell activation and overcomes tumor cell programmed death ligand 1-mediated immune suppression. *Journal Immunol* 2013;191:2829-2836
128. Robinson, B.W., Robinson, C. Lake, R.A. Localised spontaneous regression in mesothelioma -- possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 2001;32:197 - 201.
129. Robinson BW, Robinson C, Lake RA. Localised spontaneous regression in mesothelioma—possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 2001;32(2):197–201
130. Pilling, J.E., Nicholson, A.G., Harmer, C. et al. Prolonged survival due to spontaneous regression and surgical excision of malignant mesothelioma. *Ann Thorac Surg* 2007;83:314 - 315.
131. Allen, R.K. Apparent spontaneous complete regression of a multifocal malignant mesothelioma of the pleura. *Med J Aust* 2007;187, 7, 413 - 415.
132. Leigh, R.A. & Webster, I. Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S Afr Med J* 1982;61:1007 - 1009.
133. Anraku, M., Cunningham, K.S., Yun, Z., et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 135:823-829.
134. Yamada, N., Oizumi, S., Kikuchi, E., et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1543 - 1549.
135. Burt, B.M., Rodig, S.J., Tilleman, T.R., et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma. *Cancer* 2011;117:5234-5244
136. Jackaman, C., Cornwall, S., Lew, A.M., et al. Local effector failure in mesothelioma is not mediated by CD4+ CD25+ T-regulator cells. *Eur Respir J* 2009;34, 1, 162 - 175.
137. Meloni, F., Morosini, M., Solari, N., et al. Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol* 2006;67, 1-2, 1 – 12
138. Ali, G., Boldrini, L., Lucchi, M., et al. Tryptase mast cells in malignant pleural mesothelioma as an independent favorable prognostic factor. *J Thorac Oncol* 2009;4, 3, 348 - 354.
139. Schmitter, D., Lauber, B., Fagg, B. et al. Hematopoietic growth factors secreted by seven human pleural mesothelioma cell lines: interleukin-6 production as a common feature. *Int J Cancer* 1992;51: 296 - 301.
140. Sica, A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol* 2010; 32, 3, 153 - 158.
141. Kumar-Singh, S., Weyler, J., Martin, M.J., et al. Angiogenic cytokines in mesothelioma: a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF beta expression. *J Pathol* 1999;189, 1, 72 - 78.
142. Sekido, Y., Pass, H., Bader, S., et al. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 1995;55, 6, 1227-1231.
143. López-Ríos, F., Chuai, S., Flores, R., et al. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Research* 2006;66, 6, 2970-2979.

144. Romagnoli, S., Fasoli, E., Vaira, V., et al. Identification of potential therapeutic targets in malignant mesothelioma using cell-cycle gene expression analysis. *Am J Pathol* 2009;174, 3, 762-770.
145. O'Kane, S., Pound, R., Campbell, A., et al. Expression of bcl-2 family members in malignant pleural mesothelioma. *Acta Oncol* 2006;45, 4, 449-453
146. Garland, L., Rankin, C., Gandara, D., et al. Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2007;25:2406-2413.
147. Currie, A., Prosser, A., McDonnell, A., et al. Dual control of antitumor CD8 T cells through the programmed death-1/programmed death-ligand 1 pathway and immunosuppressive CD4 T cells: regulation and counterregulation. *J Immunol* 2009;183, 12, 7898-7908
148. Berthon, C., Driss, V., Liu, J., et al. In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59, 12, 1839-1849.
149. Robinson C, Callow M, Stevenson S, et al. Serologic responses in patients with malignant mesothelioma: evidence for both public and private specificities. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22(5):550–556
150. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev* 2007;220, 47 - 59.
151. Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 2008;320:674 - 677.
152. Yang H, Rivera Z, Jube S, et al. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12611-12616.
153. Carbone M, Yang H. Molecular pathways:targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2012;18:598-604
154. Ordóñez, N.G. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2008;27:1418-1428.
155. Robinson B, Creaney J, Lake R, et al. Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer* 2005;49 Suppl 1, S109–111
156. Yokokawa J, Palena C, Arlen P, et al. Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin. *Clin Cancer Res* 2005;11:6342–6351
157. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, et al. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia* 2007;21:868-876.
158. Kumar-Singh S, Segers K, Rodeck U, et al. WT1 mutation in malignant mesothelioma and WT1 immunoreactivity in relation to p53 and growth factor receptor expression, cell-type transition, and prognosis. *J Pathol* 1997;181:67-74.
159. May R.J, Dao T, Pinilla-Ibarz J, et al. Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells. *Clin Cancer Res* 2007;13:4547-4555.
160. Baldus S.E, Engelmann K, Hanisch F.G. MUC1 and the MUCs: a family of

- human mucins with impact in cancer biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 6162004;41:189-231.
161. Creaney J, Segal A, Sterrett G, et al. Overexpression and altered glycosylation of MUC1 in malignant mesothelioma. *Br J Cancer* 2008;98:1562-1569.
162. Andersen, M.H., Pedersen, L.O., Becker, J.C. et al. Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:869-872.
163. Bueno, R., Appasani, K., Mercer, H., et al. The alpha folate receptor is highly activated in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;121:225- 233.
164. Knutson, K.L., Krco, C.J., Erskine, C.L., et al. T-cell immunity to the folate receptor alpha is prevalent in women with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2006;4254-4261.
165. Christmas, T.I., Manning, L.S., Davis, M.R., et al. HLA antigen expression and malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5:213 -220.
166. Yamada, N., Oizumi, S., Kikuchi, E., et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1543 - 1549.
167. Kantoff P, Higano C, Shore N., et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2005;363:411-422.
168. Hegmans, J. Immunotherapy of Murine Malignant Mesothelioma Using Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2005;171:1168-1177.
169. Surmont V, Van Thiel E, Vermaelen K et al. Investigational approaches for mesothelioma. *Front Oncol* 2011;1:1-16
170. Claassen, E. Post-formation fluorescent labelling of liposomal membranes. In vivo detection, localisation and kinetics. *Journal of Immunological Methods* 2000;147):231-240.
171. Veltman J, Lambers M, van Nimwegen R, et al. Zoledronic acid impairs myeloid differentiation to tumour-associated macrophages in mesothelioma. *British Journal of Cancer* 2010;103:629-641.
172. Wang, B.X., Rahbar, R. Fish, E.N. Interferon: current status and future prospects in cancer therapy. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:545 - 552.
173. Sterman, D.H., Recio, A., Carroll, R.G., et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* 2007;13, 15 Pt 1, 4456 - 4466.
174. Schiavoni G, Mattei F and Gabriele L. Type I interferons as stimulators of DC-mediated cross-priming: impact on antitumor response. *Front Immunol* 2013; 1: 1-7
175. Malek, T.R. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008;26, 453 – 479
176. Foureau, D.M., McKillop, I.H., Jones, C.P., et al. Skin tumor responsiveness to interleukin-2 treatment and CD8 Foxp3+ T cell expansion in an immunocompetent mouse model. *Cancer Immunol Immunother* 2011;60, 9, 1347 -1356.
177. Porta, C., Danova, M., Orengo, A.M., et al. Interleukin-2 induces cell cycle perturbations leading to cell growth inhibition and death in malignant mesothelioma cells in vitro. *J Cell Physiol* 2000;185, 1, 126 - 134.

178. Jackaman, C., Bundell, C.S., Kinnear, B.F., et al. IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8+ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2. *J Immunol* 2003;171, 10, 5051 - 5063.
179. van Bruggen, I., Nelson, D.J., Currie, A.J., et al. Intratumoral poly-N-acetyl glucosamine-based polymer matrix provokes a prolonged local inflammatory response that, when combined with IL-2, induces regression of malignant mesothelioma in a murine model. *J Immunother* 2005;28, 4, 359 -367.
180. Caminschi, I., Venetsanakos, E., Leong, C.C., et al. Interleukin-12 induces an effective antitumor response in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:738 - 746.
181. Bernsen, M.R., Tang, J.W., Everse, et al. Interleukin 2 (IL-2) therapy: potential advantages of locoregional versus systemic administration. *Cancer Treat Rev* 1999;25, 2, 73 - 82.
182. Castagneto, B., Zai, S., Mutti, L., et al. Palliative and therapeutic activity of IL-2 immunotherapy in unresectable malignant pleural mesothelioma with pleural effusion: Results of a phase II study on 31 consecutive patients. *Lung Cancer* 2001;31, 2-3,303 - 310.
183. Friedlander, P.L., Delaune, C.L., Abadie, J.M., et al. Efficacy of CD40 ligand gene therapy in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:321 - 330.
184. Yokokawa, J., Palena, C., Arlen, P., et al. Identification of novel human CTL epitopes and their agonist epitopes of mesothelin. *Clin Cancer Res* 2005;17:6342 - 6351.
185. Ho, M., Hassan, R., Zhang, J., et al. Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:3814 - 3820.
186. Inami, K., Abe, M., Takeda, K., et al. Antitumor activity of anti-C-ERC/mesothelin monoclonal antibody in vivo. *Cancer Sci* 2010;101:969 - 974.
187. Kreitman, R.J., Hassan, R., Fitzgerald, et al. Phase I trial of continuous infusion anti-mesothelin recombinant immunotoxin SS1P. *Clin Cancer Res* 2009;15:5274 - 5279.
188. Hassan, R., Cohen, S.J., Phillips, M., et al. Phase I clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009 in patients with mesothelin-expressing cancers. *Clin Cancer Res* 2010;16:24, 6132 - 6138.
189. Krug, L.M., Dao, T., Brown, A.B., et al. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59, 10, 1467 - 1479
190. Collins, J.L. Kao, M.S. The anticancer drug, cisplatin, increases the naturally occurring cell-mediated lysis of tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1989;29, 1, 17 -22
191. Sklarin, N.T., Chahinian, A.P., Feuer, E.J., et al. Augmentation of activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) and mitomycin C by interferon in human malignant mesothelioma xenografts in nude mice. *Cancer Res* 1988;48, 1, 64 - 67.
192. Tansan, S., Emri, S., Selçuk, T., et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma with cisplatin, mitomycin C and alpha interferon. *Oncology* 1994;51, 4, 348 - 351
193. Jassar, A.S., Suzuki, E., Kapoor, V., et al. Activation of tumor-associated macrophages by the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid induces an effective CD8+ T-cell-mediated antitumor immune response in murine models of lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res* 2005;65, 24,11752 - 11761.

194. Anraku, M., Cunningham, K.S., Yun, Z., et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135, 4, 823 - 829.
195. Su, L., Liu, G., Hao, X., et al. Death Receptor 5 and cellular FLICE-inhibitory protein regulate pemetrexed-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Eur J Cancer* 2011;47:2471-2478
196. Bareford, M.D., Hamed, H.A., Tang, Y., et al. Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells. *Autophagy* 2007;7:10
197. Anraku, M., Tagawa, T., Wu, L., et al. Synergistic antitumor effects of regulatory T cell blockade combined with pemetrexed in murine malignant mesothelioma. *J Immunol* 2010;185, 2,956 – 966
198. McCoy MJ, Nowak AK, Lake RA. Chemoimmunotherapy: an emerging strategy for the treatment of malignant mesothelioma. *Tissue Antigens* 2009;74(1):1–10
199. Ireland D, Kissick H and Beilharz M. The role of regulatory T cells in mesothelioma. *Cancer Microenvironment* 2012;5;165-172
200. Ribas A. Clinical development of the antiCTLA-4 antibody tremelimumab. *Semin Oncol* 2010;450-454
201. Ribas A, Kefford R, Marshall MA, et al. phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard of care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31:616-622
202. Calabro L, Morra A, Fonzatti E, et al. Tremelimumab for patients with Chemotherapy-resistant advanced malignant mesothelioma: an open-label, single arm, phase 2 trial. *Lancet oncol* 2013;1104-1111
203. Zucali PA, Simonelli M, Michetti G, et al. Second-line Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma: results of a retrospective multicenter survey. *Lung Cancer* 2012;75:360-367
204. Hirano, F., Kaneko, H., Tamura, et al. Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res.* 2005;65: 1089–1096.
205. He, Y. F., Zhang, X. H. Wang, et al. Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *J. Immunol.* 2004;173: 4919–4928.
206. Franceschini, D., Paroli, V. Francavilla, et al. PD-L1 negatively regulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.* 2009;119: 551–564.
207. Currie A, Prosser A, McDonnell A, et al. Dual control of antitumor CD8T cells through the Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 pathway and immunosuppressive CD4 T cells: regulation and counterregulation- *J immunol* 2009;183:7898-7908
208. Blayney JK, Ceresoli GL, Castagneto B, et al. Response to chemotherapy in relation to longer overall survival in an individual patients combined-analysis with pleural mesothelioma. *Eur J cancer* 2012, 48:2983-2992
209. Steele JPC, Klabatsa A, Fennell DA, et al. Prognostic factors in mesothelioma. *Lung Cancer.* 2005;49 (Suppl):S49-52.

210. Wolf AS, Richards WG, Tilleman TR, et al. Characteristics of malignant pleural mesothelioma in women. *Ann Thorac Surg* 2010;90:949-56.
211. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. CD8 T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3491-3494
212. Schamcher K, Haensch W, Roefzaad C, et al. Prognostic significance of activated CD8Tcell infiltration within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:3932-3936
213. Sato E, Olson HS, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8 tumor infiltrating lymphocytes and a high CD8/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 2005;102:18538-18543
214. Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8 T lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 2001;61:5132-5136
215. Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, et al. CD4 T cells in cancer stroma, not CD8 T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 2003;94:1003-1009
216. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long term follow up. *Cancer research* 2006 66:3381-3385
217. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single agent anti-programmed death 1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 2010;28:2167-2175
218. Gao Q, Wang X, Quiu S, et al. overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:971-979.
219. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *PNAS* 2007;27:3360-3365
220. Afanasiev O, Yelistrova L, Miller N, et al. Merkel polyomavirus specific T cells fluctuate with Merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clin Cancer Res* 2013;19:5351-5360
221. Lyford-Pike S, Peng S, Young G et al. Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2013;73:1733-1741
222. Muenst S, Soysal S, Gao F, et al. the presence of programmed death 1 (PD-1) positive tumor infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2013;139:667-676
223. Velcheti V, Schalper K, Carvajal D, et al. Programmed death ligand-1 expression un non small cell lung cancer. *Laboratory investigation* 2014;94:107-116
224. Taube JM, Anders RA, Young GD, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127-137
225. Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, et al. Regulatory T cells and the B7-H1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors. *Neuro Oncol* 2009;11:394-402.
226. Nomi T, Sho M, Akahori T, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2151-7.

227. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, et al. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56:1173–82.
228. Wu C, Zhu Y, Jiang J, et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem* 2006; 108:19–24.
229. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947–53
230. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, et al. B7-H1 expression on non small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004;10:5094–100.
231. Mu CY, Huang JA, Chen Y, et al. High expression of B7-H1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol* 2011;28:682–8.
232. Chen YB, Mu CY, Huang JA. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* 2012;98:751–755