

**EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN
MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA
INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL
INMUNE**

Jairo Andrés Zuluaga León
Juan Carlos Mejía
Walter Andrés Rincón

Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Oncología Clínica
Instituto Nacional de Cancerología

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA - UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN ONCOLOGÍA CLÍNICA
BOGOTÁ ENE/2019

**EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN
MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA
INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL
INMUNE**

ESTUDIO DESCRIPTIVO TIPO CORTE TRANSVERSAL
INVESTIGACIÓN DE POSTGRADO

Jairo Andrés Zuluaga León
Juan Carlos Mejía
Walter Andrés Rincón

Asesores Temáticos:
Josefa Antonia Rodríguez
Ricardo Elías Bruges

Asesor Metodológico:
Mario Mendoza Obyrne

Universidad el Bosque
VICERRECTORÍA ACADÉMICA
División de Postgrados y Formación avanzada Facultad de Medicina
Oncología clínica
Instituto Nacional de Cancerología. Bogotá D.C. Colombia
Bogotá, Feb/2019

Página de aprobación

La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

Agradecimientos

A nuestras familias, quienes con su sacrificio, ejemplo y motivación plantaron la senda que rige nuestros caminos

Tabla de contenido

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE	1
EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE	2
I. INTRODUCCIÓN	11
II. MARCO TEÓRICO	15
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. OBJETIVO	23
a. OBJETIVO GENERAL	23
b. ESPECÍFICOS	23
V. METODOLOGÍA	25
a. Diseño del estudio	25
b. Pregunta de investigación	25
c. Definición de sujetos del estudio	26
d. Descripción de las intervenciones	27
e. Procedimientos	28
f. Plan de análisis	30
VI. CONDUCCIÓN DEL ESTUDIO	41
a. Sitios de investigación	41
b. Manejo de sustancias o especímenes biológicos	41
c. Archivo de datos y sistematización	41
d. Consideraciones éticas	42
e. Seguridad	43

f.	Consideraciones ambientales	43
g.	Confidencialidad	43
h.	Aseguramiento y control de calidad	43
VII.	RESULTADOS/ PRODUCTOS ESPERADOS	44
VIII.	REFERENCIAS	46
IX.	CRONOGRAMA GENERAL DE ACTIVIDADES	49
X.	PRESUPUESTO	51

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Criterios de selección	26
Tabla 2.	Variables del estudio	30
Tabla 3.	Características de seguimiento del paciente	39
Tabla 4.	Relacionados con la generación de conocimiento y/o nuevos desarrollos tecnológicos	43
Tabla 5.	Conducentes al fortalecimiento de la capacidad científica nacional	43
Tabla 6.	Dirigidos a la aprobación social del conocimiento	43
Tabla 7.	Impacto esperado a partir del uso de los resultados	44

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública, cuya incidencia y mortalidad se ha incrementado durante los últimos años pese al desarrollo de alternativas terapéuticas como la inmunoterapia dirigida contra los puntos de control de la respuesta inmune (1). Esta terapia utiliza anticuerpos monoclonales para bloquear moléculas que regulan negativamente la función de los linfocitos T (LT) activados, y restablecer la respuesta inmune antitumoral. Varios de estos han sido aprobados en el manejo de algunos tipos de cáncer.

Ensayos clínicos basados en estas terapias han demostrado un impacto significativo en la supervivencia global en melanoma metastásico(5-7), sin embargo, su eficacia es limitada y sus efectos adversos elocuentes(8). Esta eficacia limitada, puede relacionarse con alteraciones en la expresión de moléculas del antígeno de los leucocitos humanos en el tumor. La detección de las alteraciones en su expresión podría ser una metodología adecuada para determinar cuáles pacientes se podrían beneficiar de estas inmunoterapias (10).

La evaluación de biomarcadores inmunes podría ofrecer información valiosa para elegir la terapia o la combinación de terapias óptimas para cada paciente(15).

Dado que aún no se dispone de un biomarcador validado para predecir la efectividad de las inmunoterapias en el tratamiento del cáncer, en este estudio proponemos determinar si el inmunofenotipo HLA en el tumor y las poblaciones celulares que componen el infiltrado tumoral se correlacionan con la respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune, en pacientes con diagnóstico de melanoma irresecable, y refractario al tratamiento en una cohorte retrospectiva de pacientes con melanoma tratados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC).

Palabras Clave: HLA, melanoma, inmunoterapia, biomarcadores

ABSTRACT

Cancer is a public health problem, whose incidence and mortality has increased in recent years despite the development of therapeutic alternatives such as immunotherapy directed against the immune response control points (1). This therapy uses monoclonal antibodies to block molecules that negatively regulate the function of activated T lymphocytes (LT), and restore the antitumor immune response. Several of these have been approved in the management of some types of cancer.

Clinical trials based on these therapies have shown a significant impact on overall survival in metastatic melanoma (5-7), however, their efficacy is limited and their adverse effects eloquent (8). This limited efficacy may be related to alterations in the expression of antigen molecules of human leukocytes in the tumor. The detection of alterations in their expression could be an adequate methodology to determine which patients could benefit from these immunotherapies (10).

Evaluation of immune biomarkers could offer valuable information to choose the therapy or combination of optimal therapies for each patient (15).

Given that a validated biomarker is not yet available to predict the effectiveness of immunotherapies in the treatment of cancer, in this study we propose to determine whether the HLA immunophenotype in the tumor and the cell populations that make up the tumor infiltrate correlate with the clinical response to immunotherapy to block the control points of the immune response, in patients with a diagnosis of unresectable melanoma, and refractory to treatment in a retrospective cohort of patients with melanoma treated at the National Cancer Institute (INC).

Keywords: HLA, Melanoma; Immunotherapy, Biomarkers

I. Introducción

El cáncer es un problema de salud pública, cuya incidencia y mortalidad se ha incrementado durante los últimos años pese al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas tales como la inmunoterapia dirigida contra los puntos de control de la respuesta inmune (1). Esta terapia utiliza anticuerpos monoclonales para bloquear moléculas que regulan negativamente la función de los linfocitos T (LT) activados, y de esta manera, restablecer la respuesta inmune antitumoral. Varios de estos anticuerpos han sido aprobados para su uso en el manejo de algunos tipos de cáncer: Ipilimumab(anti CTLA-4)(2), nivolumab y pembrolizumab(anti PD1) fueron aprobados inicialmente para el tratamiento del melanoma metastásico irresecable(3;4). Estas inmunoterapias, solas o en combinación, se han incluido paulatinamente para el tratamiento de otros tipos de cáncer como pulmón, riñón, cabeza y cuello y próstata, entre otros.

Los ensayos clínicos con terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales para la inhibición de los puntos de control de la respuesta inmune han demostrado un impacto significativo en la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global alcanzada con la inmunoterapia en melanoma metastásico(5-7), sin embargo, su eficacia es limitada y sus efectos adversos de origen inmune pueden afectar cualquier sistema y ser potencialmente mortales(8). Esta eficacia limitada de la respuesta, puede estar relacionada con las alteraciones en la expresión de moléculas del antígeno de los leucocitos humanos (HLA, por sus siglas en inglés) en el tumor, puesto que la expresión de CTLA-4 y PD1, en el linfocito T, depende de su activación y esta a su vez depende del reconocimiento del antígeno en una molécula de HLA-I clásica por el TCR de un linfocito T CD8+(9). Dado

que este reconocimiento es la primera señal requerida para la activación de los LT, la detección de las alteraciones en la expresión de HLA-I podría ser una metodología adecuada para determinar cuáles pacientes se podrían beneficiar de estas inmunoterapias (10).

Se debe tener en cuenta que existen varios eventos críticos y tempranos en la carcinogénesis que favorecen la progresión tumoral por evasión de la vigilancia inmune. La presencia de múltiples alteraciones en la expresión de las moléculas de HLA-I (clásicas (HLA-A, -B, -C) y no-clásicas (HLA-E, -F, -G)) y de HLA-II (HLA-DP, -DQ, -DR)), es consecuencia de la presión inmune ejercida sobre las células tumorales que conduce al surgimiento de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida capaces de evadir al sistema inmune. En cáncer de esófago se ha reportado la regulación negativa de HLA-I sumada a la sobrerregulación de HLA-II, pero no es claro si este fenotipo es causa o consecuencia de la transformación maligna(11), Por otra parte, Zeestraten y colaboradores, encontraron en cáncer de colon, tres fenotipos inmunes relacionados con el resultado clínico de los pacientes al combinar varios biomarcadores inmunes (12).

La molécula de HLA-I no-clásica, HLA-G, tiene función inhibidora y está involucrada en la tolerancia inmune y el inmuno-escape. Esta molécula tiene un efecto deletéreo en la respuesta inmune debido a que en cáncer, sobre-regula sus ligandos (ILT2, ILT3, ILT4, y KIR2DL4) en las células presentadoras de antígeno, células NK y LT (13), y se correlaciona con un mal pronóstico. HLA-G (soluble o de membrana), se ha propuesto como un biomarcador de diagnóstico, pronóstico o seguimiento (14) y se sugiere que puede

tener valor terapéutico para revertir la tolerancia local y sistémica e incrementar la eficacia de las inmunoterapias.

Datos recolectados en grandes cohortes de cáncer en humanos, han demostrado el valor pronóstico de la clasificación inmune y el impacto que podría tener su establecimiento dentro del sistema de clasificación tumoral de la UICC-AJCC: tumor, nódulo, metástasis (TNM). La evaluación de biomarcadores inmunes locales y sistémicos podría ofrecer información valiosa en cuanto al perfil inmune individual para elegir la terapia o la combinación de terapias óptimas para cada paciente(15). Dado el gran impacto que ha tenido la aprobación de anticuerpos dirigidos contra los puntos de control inmune, y teniendo en cuenta el rol fundamental las moléculas de HLA-I para la activación de los LT, es importante definir si la detección de alteraciones en la expresión de HLA en el tumor puede ser útil como biomarcador de respuesta a la inmunoterapia para seleccionar a los pacientes que no responderán, con el fin de ofrecerles otras alternativas terapéuticas.

Numerosos estudios demuestran que los tumores desarrollan mecanismos de evasión de la inmunidad antitumoral y el principal mecanismo de evasión utilizado por el tumor para escapar al reconocimiento inmune es la alteración en la expresión de moléculas de HLA-I clásicas (HLA-Ia)(16-19). Dado que aún no se dispone de un biomarcador validado para predecir la efectividad de las inmunoterapias en el tratamiento del cáncer, en este estudio proponemos determinar si el inmunofenotipo HLA en el tumor y las poblaciones celulares que componen el infiltrado tumoral se correlacionan con la respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune, en pacientes con diagnóstico de melanoma irsecable, y refractario al tratamiento en una

cohorte retrospectiva de pacientes con melanoma tratados en el Instituto Nacional de Cancerología (INC).

Para ello, determinaremos las alteraciones en la expresión de HLA-I, la expresión de CTLA-4 y PD1 en los linfocitos infiltrantes de tumor y PDL1 en las células tumorales, y analizaremos las poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor, mediante técnicas inmunohistoquímicas, PCR locus específica y análisis de pérdidas de heterocigosis (LOH)(20), en muestras de tejido tumoral embebido en parafina, obtenido del Banco Nacional de Tumores, Terry Fox, del INC. La realización de las pruebas moleculares estará a cargo del grupo de investigación en Biología del Cáncer y el grupo de patología, mientras que el análisis e interpretación de los resultados se realizará en conjunto con el grupo de oncología clínica del INC.

II. Marco Teórico

El Melanoma Maligno (MM), un tumor derivado de las células neuro ectodérmicas a partir de los melanocitos, es considerado una neoplasia heterogénea y compleja. Las tasas de incidencia varían de acuerdo al género, grupo etario y grupos étnicos. Datos de GLOBOCAN ubican al melanoma en el décimo noveno lugar del cáncer más común a nivel mundial, con tasas de incidencia estandarizadas por edad de 2.3-8.1 por 100.000 (27). En la actualidad es considerado un problema de salud pública por su morbilidad significativa y sus altas tasas de mortalidad. La localización más frecuente de este tipo de cáncer, es en sitios acrales (42%), seguido por cabeza y cuello mientras que el subtipo clínico más frecuente es el lentiginoso acral (43%), seguido por el lentigo maligno (24%), y el de extensión superficial (14 %). La etapa clínica más frecuente al diagnóstico es III (26%), seguido por 0 y I (19 y 18% respectivamente) (28)

El MM puede originarse en la piel normal, en un nevus benigno y en un nevus displásico, correspondiendo este último a una etapa intermedia. Se correlaciona con la exposición intermitente a la luz solar, la cantidad acumulada de exposición y la respuesta al foto daño. La radiación ultravioleta (UVA y UVB) juega un papel fundamental en la inducción de genotoxicidad directa (29), por lo cual se considera que la exposición al sol es uno de los principales factores de riesgo. Por otra parte, tener foto-tipo de piel I y II incrementa el riesgo de desarrollar MM en comparación con tener foto-tipo III o IV. (30)

Hasta la mitad del siglo XX, la resección local amplia y la extirpación de ganglios linfáticos era la única alternativa terapéutica para el melanoma (31). Sin embargo, en la

actualidad hay otras opciones terapéuticas disponibles incluso para la enfermedad irreseccable o metastásica tales como la quimioterapia convencional, la terapia dirigida como monoterapia o combinada, y la inmunoterapia (32). Múltiples ensayos clínicos han evaluado el efecto de las inmunoterapias en el melanoma avanzado o metastásico con resultados contradictorios: ensayos clínicos demuestran que si bien es cierto que altas dosis de interferón α (IFN α) puede retrasar la progresión metastásica a distancia, esta terapia genera toxicidad y no tiene un impacto significativo en la supervivencia global. En la medida en que se desarrollen nuevas estrategias de medicina personalizada, será crucial identificar biomarcadores para predecir la respuesta clínica a las inmunoterapias.

Para el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral citotóxica, específica y eficiente, se requiere la colaboración entre actores de la inmunidad innata (Células NK y mieloides) y adaptativa (LT) que participan en el rechazo al tumor mediante el reconocimiento de antígenos tumorales específicos (33) expresados de novo por las células durante su transformación maligna. En melanoma, los LT antitumorales pueden reconocer péptidos comunes derivados de proteínas específicas de melanocitos que se expresan en la mayoría de los melanomas como la tirosinasa y la B-catenina (34;35). Por su parte, la inmunidad antitumoral adaptativa está mediada por el reconocimiento del complejo HLA-I/péptido en las células tumorales por el TCR de los LT CD8+ específicos. Las moléculas de HLA-I se expresan en las células nucleadas y presentan antígenos propios a los LTCD8+ que, para el caso de las células tumorales, son péptidos alterados que las hacen altamente inmunogénicas y susceptibles de ser destruidas por los LT citotóxicos. Sin embargo, las células crecen, invaden y hacen metástasis en un hospedero saludable(36),

debido en parte al desarrollo de mecanismos de evasión tumoral, que les permiten escapar al reconocimiento inmune.

Las alteraciones en la expresión de HLA-I constituyen el principal mecanismo de evasión tumoral y el mayor obstáculo para el tratamiento de tumores con inmunoterapias basadas en péptidos, transferencia adoptiva con células dendríticas y LT(37), o bloqueo de los puntos de control inmune, porque afecta el reconocimiento de las células tumorales y la activación de los LT(26). En pacientes con melanoma, se ha observado una falta de respuesta a la terapia basada en péptidos tumorales específicos para LT, asociada con la pérdida total de la expresión de HLA-I en la superficie de la célula tumoral debido a mutaciones en la $\beta 2m$ (38).

Múltiples mecanismos conducen a una pérdida total o parcial de la expresión de HLA-I en las células tumorales y generan diferentes fenotipos HLA alterados: i) pérdida total de la expresión, ii) pérdida de haplotipo, iii) pérdida de locus A, B, o C, iv) pérdida alélica, v) fenotipo compuesto, vi) no respuesta a interferones y vii) regulación negativa de HLA-I clásicas y aparición de HLA-I no-clásicas). Estos fenotipos alterados tienen un profundo impacto en la inmunidad antitumoral (39;40) y los primeros se generan principalmente por la presencia de anomalías cromosómicas como la LOH en los genes que codifican para HLA mientras que el último es un mecanismo de evasión utilizado por el tumor para evitar el reconocimiento y abolir la respuesta inmune antitumoral. La LOH es un evento temprano y frecuente en el desarrollo del cáncer y se asocian con un microambiente tumoral repleto de efectores inmunes y con la expresión de PDL1, el receptor inhibitorio para PD1. La expresión de PDL1 refleja la existencia de una

respuesta inmune adaptativa por parte de un sistema inmune activado, consistente con la hipótesis de que la LOH en HLA puede favorecer el escape inmune en un microambiente inmuno-activado (20).

Adicional a estas alteraciones, la población de células inmunes que infiltra el tumor juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer al generar un microambiente tumoral que puede ser favorable o desfavorable para el desarrollo tumoral. Los macrófagos, por ejemplo, se diferencian en 2 poblaciones con funciones opuestas: Los M1 participan activamente en la eliminación de células tumorales (41), mientras que los M2, promueven el desarrollo de tolerancia favoreciendo el crecimiento tumoral (42). Por otra parte, los LT reguladores (LTreg) y las células supresoras de origen mieloide (MDSC), inhiben la actividad citotóxica de los LT efectores (43), y favorecen el crecimiento tumoral, y el desarrollo de metástasis (44).

Lo anteriormente expuesto resalta el papel de la respuesta inmune en el curso clínico de la enfermedad. Si bien es cierto que un microambiente tumoral polarizado hacia Th1 e infiltrado por LT citotóxicos y de memoria tiene un impacto pronóstico importante, se deben considerar otros parámetros como las alteraciones en la expresión de HLA y la composición del infiltrado inmune entre otros, para predecir de manera reproducible y robusta la respuesta a la inmunoterapia e identificar de manera más precisa el tipo de terapia adecuada para cada paciente.

III. Justificación

El melanoma maligno se ha convertido en un problema de salud pública debido al incremento en su incidencia y mortalidad aunque aún no se ha alcanzado el acmé de la incidencia. A pesar de que representa el 5% de los tumores malignos de piel, aporta entre el 75-90% de las muertes por esta causa. En Colombia, su incidencia ha ido incrementándose desde 1982 cuando se reportaron 1.6 casos por cada 100.000 habitantes. Para el periodo comprendido entre 2007 y 2011 se reportaron 3 casos por cada 100.000 habitantes. Con respecto a la mortalidad, se reportó en hombres una tasa de 0,6 y en mujeres 0,5 por 100.000 habitantes. (21)

La ausencia de métodos de tamización para el diagnóstico temprano del melanoma, hace que éste sea diagnosticado en estadio localmente avanzado, irresecable o metastásico, cuando su tratamiento requiere el uso de terapias sistémicas. La variable patológica más importante para determinar el pronóstico del paciente es el espesor tumoral, seguido por la ulceración histológica y la rata mitótica. Por otra parte, la supervivencia global disminuye en relación con la etapa clínica al momento del diagnóstico, con una sobrevida a 10 años cercana al 50%, lo cual es una desproporción entre la incidencia y la mortalidad atribuible al melanoma.

Actualmente se vienen desarrollado terapias basadas en la inhibición de los puntos de control de la respuesta inmune (CTLA-4, PD1 y PDL1), muchas de las cuales han sido aprobadas para su uso en la clínica, siendo el melanoma maligno metastásico una de las tres primeras indicaciones para la formulación de inmunoterapia en el país y la primera

indicación en el INC, con un recobro nacional al sistema de salud cercano a los 5.000 millones de pesos hasta el tercer trimestre de 2017. Lo anterior resalta la importancia de desarrollar una herramienta que permita predecir cuales pacientes tendrán el mayor impacto en las tasas de supervivencia con estos tratamientos dado que, aunque es indiscutible el impacto alcanzado con la inmunoterapia en la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en melanoma metastásico, a la fecha no existe ningún biomarcador validado para determinar cuáles pacientes se deben incluir en los protocolos inmuno-terapéuticos basados en la activación de LT o en el bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune.

La evaluación de la expresión de HLA en las células tumorales tiene valor pronóstico en tumores de diverso origen y en melanoma maligno, se ha descrito que la pérdida o disminución de la expresión de HLA-I clásica (HLA-A,-B,-C) influye en la magnitud de la respuesta a la terapia farmacológica y en la sobrevida de los pacientes(22), mientras que la expresión aberrante de moléculas de HLA de clase I no-clásicas (HLA-E,-F,-G), en especial HLA-G(23;24), y la presencia de células T reguladoras (Treg) infiltrando el tumor, se correlaciona con la progresión tumoral y una menor sobrevida(25).

El INC es un centro de atención de cuarta complejidad que cuenta con grupo interdisciplinario de especialistas en áreas clínicas, genéticas, imagenológicas y patológicas con entrenamiento en el diagnóstico y manejo del cáncer y sus complicaciones. Simultáneamente, es un centro de formación para profesionales en pre y postgrado en diversas áreas de la salud e investigación. Entre el 1 de junio de 2014 y el 30 junio de 2017, 40 pacientes con melanoma irreseccable o metastásico fueron tratados con pembrolizumab

y nivolumab (anti PD1) o ipilimumab (anti CTLA-4), y a pesar de que se observó un incremento en las tasas de respuesta, este incremento solo se observó en algunos de los pacientes incluidos. Dado que numerosos estudios confirman la utilidad de la evaluación del perfil de expresión de HLA como biomarcador de diagnóstico, pronóstico o de seguimiento(12;20;22;26), en el presente estudio proponemos evaluar el fenotipo HLA y las características del infiltrado inmune en los tumores de estos pacientes para determinar si se correlaciona con la respuesta clínica observada, con el fin de establecer si la falta de respuesta a la inmunoterapia en algunos de estos pacientes pudo deberse a que sus tumores tenían un fenotipo HLA alterado y/o un infiltrado inmune regulador capaz de anular su efecto clínico.

La importancia de este trabajo radica en el hecho de que a futuro puede conducir a la implementación de un protocolo para predecir la respuesta clínica a la inmunoterapia y discriminar los pacientes que se beneficiarán de las inmunoterapias basadas en la activación de los linfocitos T antes de su inclusión en estos esquemas terapéuticos. Por otra parte, este estudio también podría conducir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la normalización de la expresión de HLA-I, con el fin de mejorar la eficacia de las inmunoterapias al revertir la tolerancia local y sistémica. Adicionalmente, dado que el desarrollo de estudios traslacionales supone la alianza entre equipos interdisciplinarios para trasladar los resultados de la investigación básica a la clínica, con el desarrollo de este proyecto se establece una colaboración entre el departamento de Oncología Clínica, el departamento de Patología Oncológica y el Grupo de Investigación en Biología del Cáncer del INC, para desarrollar una línea de investigación que permita determinar el impacto de las alteraciones en la expresión de HLA en la respuesta clínica a

estas inmunoterapias y a futuro, desarrollar protocolos con utilidad clínica para el tratamiento personalizado del cáncer.

IV. Objetivos

a. General:

Determinar si existe una asociación entre la presencia de alteraciones en la expresión de HLA en el tumor, las poblaciones de Linfocitos infiltrantes de tumor y la respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune en pacientes con diagnóstico de melanoma irresecable o metastásico y resistente a los tratamientos convencionales, atendidos en el INC entre el 1 de junio de 2014 y el 30 junio de 2017.

b. Específicos:

i. Describir las características demográficas, histológicas, imagenológicas, patológicas y moleculares en una cohorte de pacientes con diagnóstico de melanoma metastásico irresecable y refractario a las diferentes líneas de terapias recibidas, valorados por el grupo de Oncología Clínica en el INC.

ii. Determinar el fenotipo HLA, la ocurrencia de pérdidas de heterocigosis y las características de la población de linfocitos infiltrantes de tumor, en biopsias de melanoma obtenidas de pacientes tratados con inmunoterapias basadas en el bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune (CTLA-4/CD28; PD1/PDL1), al momento del diagnóstico.

iii. Evaluar la potencial utilidad clínica de incluir el análisis de las alteraciones en HLA y las poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor para determinar cuáles pacientes con melanoma metastásico irresecable y refractario al tratamiento convencional, se

pueden incluir en los protocolos inmuno-terapéuticos basados en la activación de LT o en el bloqueo de los puntos de control inmune.

V. Metodología

a. Diseño del estudio:

El presente es un estudio descriptivo tipo corte transversal.

b. Pregunta de investigación

La respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control de la respuesta inmune, en pacientes con diagnóstico de melanoma irresecable y refractario al tratamiento se puede predecir mediante el análisis del infiltrado inmune y las alteraciones en la expresión de HLA-I en el tumor?

Para responder esta pregunta, se determinarán las alteraciones en la expresión de HLA-I en el tumor, la caracterización del infiltrado tumoral y la expresión de la CTLA-4, y PD1 en los linfocitos infiltrantes de tumor y PDL1 en las células tumorales mediante técnicas moleculares como Inmunohistoquímica, PCR locus específica y determinación de LOH, en muestras de tejido tumoral embebido en parafina, obtenido del Banco Nacional de Tumores, Terry Fox, del INC. La realización de las pruebas moleculares estará a cargo del grupo de investigación en Biología del Cáncer y el departamento de patología oncológica, mientras que el análisis e interpretación de los resultados y la escritura de los artículos producto del estudio se realizará en conjunto con los grupos de oncología clínica y patología oncológica.

c. Definición de sujetos de estudio

i. Población:

Pacientes con diagnóstico de melanoma irresecable (considerado por grupo quirúrgico) o metastásico de acuerdo con la American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7ma edición, que fueron tratados en el grupo de oncología clínica del INC, durante el periodo comprendido entre el 1 de junio de 2014 y el 30 de junio de 2017.

1. Población blanco:

Se incluirán muestras embebidas en parafina de pacientes con melanoma irresecable (considerado por grupo quirúrgico) o metastásico de acuerdo con la American Joint Committee on Cancer (AJCC) edición 7ma; tratados en el grupo de oncología clínica del INC con inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control inmune: (pembrolizumab, nivolumab o ipilimumab), durante el periodo comprendido entre el 1 de junio de 2014 y el 30 de junio de 2017.

2. Población elegible:

Pacientes con melanoma irresecable (considerado por grupo quirúrgico) o metastásico de acuerdo con la American Joint Committee on Cancer (AJCC) edición 7ma; tratados con inmunoterapia (pembrolizumab, nivolumab o ipilimumab) atendidos en el INC entre el 1 de junio de 2014 y el 30 junio de 2017 con suficiente disponibilidad de tejido histopatológico del sitio primario y/o metastásico.

3. Criterios de selección

Tabla 1. Criterios de selección

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none"> - Mayor de edad con deseo de participar en el estudio - Diagnóstico de melanoma confirmado histopatológicamente. - Pacientes en etapa clínica IIIA, IIIB, IIIC y IV. - ECOG menor o igual 2. - Administración de inmunoterapia (pembrolizumab, nivolumab o ipilimumab) - Disponibilidad de tejido histopatológico del sitio primario y/o metastásico para determinar la expresión HLA en las células tumorales de melanoma. 	<ul style="list-style-type: none"> - Imposibilidad para obtener consentimiento informado para análisis de muestras futuras o disentimiento para las mismas. - Imposibilidad para obtener los datos completos de los pacientes con respecto a las características demográficas, histológicas y patológicas.

Aplicando estos criterios de inclusión, se espera obtener un total de 40 pacientes.

d. Descripción de las intervenciones:

i. Toma de muestra:

Se utilizarán muestras obtenidas del Banco Nacional de tumores Terry Fox del INC., que cuenten con consentimiento informado para análisis de muestras futuras, previa revisión de las historias clínicas para verificar el cumplimiento de los criterios de inclusión en el estudio y el registro de los datos completos de los pacientes con respecto a las características demográficas, histológicas y patológicas y para garantizar que se cuenta con la información necesaria para realizar el seguimiento clínico de la evolución de los pacientes durante un año. Sobre estas muestras se determinarán las pérdidas de heterocigosis (LOH) en 6p21.3 mediante técnicas moleculares, la expresión de HLA en las células tumorales y detección del infiltrado inmune en el tumor mediante inmunohistoquímica a partir del tejido histopatológico obtenido del banco de tumores del INC, descartando las muestras insuficientes. La interpretación de resultados estará a cargo personal especializado en dichas técnicas.

e. Procedimientos

i. Selección de sujetos de investigación

- Detectar mediante diagnóstico CIE10 los pacientes con melanoma irreseccable o metastásico, valorados en consulta externa de oncología clínica del INC.

- Determinar mediante la revisión de historia clínica, si los pacientes ya mencionados recibieron tratamiento con inmunoterapia (pembrolizumab, nivolumab o ipilimumab).

- Verificar en el banco de tumores si los pacientes captados cuentan con suficiente tejido histopatológico disponible.

- Recolectar los datos mediante un formato diseñado en RedCAP con previa aprobación de la unidad de análisis del INC. El correcto diligenciamiento de los formatos del estudio será verificado por el investigador principal y posteriormente por el grupo de monitoria.

ii. Descripción de las características demográficas, histológicas y patológicas:

- Registrar la información en el formato electrónico REDcap, según indicaciones del grupo de análisis de datos del INC.

- Verificar la calidad de la información mediante doble digitación llevada a cabo por dos investigadores. En caso de inconsistencias, se resolverán mediante una nueva revisión de la historia clínica.

iii. Evaluación del fenotipo HLA en tumores en pacientes con melanoma metastásico

- Determinar la ocurrencia de pérdidas alélicas, de locus y/o de haplotipo, en la región 6p21.3 que codifica para las moléculas de HLA mediante análisis de micro satélites para detectar LOH.

- Evaluar la expresión de moléculas clásicas de HLA-I mediante inmunohistoquímica.

- Evaluar la expresión HLA-G, una molécula no-clásicas de HLA en la membrana de las células tumorales.

- Determinar el impacto de la LOH en la región de HLA para la evolución del tumor.

- Comparar la eficacia de la inmunoterapia basada en el bloqueo de los puntos de control inmune en los pacientes con diferentes fenotipos HLA, en términos de respuesta completa, respuesta parcial, tasa de beneficio clínico, supervivencia libre de progresión y supervivencia global.

f. Plan de análisis

Dada la naturaleza del estudio, se emplearán métodos de análisis estadísticos y se estimarán las siguientes herramientas estadísticas descriptivas: Con los datos obtenidos en las variables de caracterización de la población se determinará la distribución por frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas, y se obtendrán medidas de tendencia central como la media, la mediana, y las medidas de dispersión como la desviación estándar y el rango intercuartílico para las variables continuas.. Se realizarán pruebas de normalidad para las variables cuantitativas y posteriormente se realizará ya sea la prueba t para muestras dependientes o la prueba U de Mann Whitney de acuerdo al cumplimiento o no de la distribución normal de los datos.

Para el cálculo de la asociación entre el fenotipo HLA de los tumores, la composición del infiltrado tumoral y la respuesta clínica a la inmunoterapia de bloqueo de los puntos de control inmune, se calculará la razón de prevalencias de alteraciones en la expresión de HLA en los tumores versus los tumores que no presentan alteraciones en la expresión de HLA obteniéndose para esta medida de asociación su intervalo de confianza y su significancia estadística, y se determinará si estas alteraciones se correlacionan con la respuesta clínica a los protocolos inmuno-terapéuticos que se manejan en el INC. Para el análisis estadístico se usará el programa Stata®11 y se utilizara el lenguaje R en búsqueda de alguna correlación entre el fenotipo HLA de los tumores, la composición del infiltrado tumoral y la respuesta clínica a la inmunoterapia

Tabla 2. Variables del estudio

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Formulario número	Número secuencial de la recolección de historias.	No aplica	No aplica
Fecha de recolección	Fecha en la cual se diligencia el formulario de recolección.	No aplica	dd/mm/aaaa
Historia clínica	Número de identificación en el INC	No aplica	No aplica
Número documento identidad	Número de identificación	No aplica	No aplica
Características sociodemográficas			
Fecha de nacimiento	Fecha de nacimiento del sujeto a estudio	No aplica	dd/mm/aaaa
Edad	Años cumplidos al inicio de la inmunoterapia registrado en historia clínica.	Cuantitativa discreta	Años cumplidos
Régimen de salud	Tipo de régimen de salud al cual el paciente se encuentra afiliado en el momento del inicio de la inmunoterapia	Categoría nominal	1. Subsidiado 2. Contributivo 3. Régimen especial 4. Particular 5. Otro ¿Cuál?
Características clínicas			
Peso	Peso del paciente en primera cita de control por oncología, y en cada una de las citas de control por oncología.	Cuantitativa continua	Kilogramos
Talla	Longitud del paciente en la primera cita de control por oncología tomada de la historia clínica	Cuantitativa continua	Centímetros
Índice de masa corporal (IMC)	Relación entre peso del paciente tomado en cada una de las consultas y la talla tomada en la primera cita.	Cuantitativa continua	Kilogramos/metro cuadrado
Superficie corporal	Definida por la formula Dubois	Cuantitativa continua	Metros cuadrados
Estado funcional	Estado funcional del paciente al inicio del tratamiento y en cada cita de control por oncología clasificado por la escala ECOG.	Cualitativa ordinal	1. 0 2. 1 3. 2 4 Otro
Tamaño tumoral por examen físico	Medición de los diámetros mayores del tumor en mm al inicio del estudio, tomado de la historia clínica cuando esté disponible	Cuantitativa continua	Reporte en mm
Tamaño tumoral por imágenes	Medición de los diámetros mayores del tumor en mm. Tomado del registro de imágenes iniciales y de seguimiento	Cuantitativa continua	Reporte en mm
Estado de ganglios regionales	Tamaño y número de ganglios linfáticos regionales, según TNM. Tomado de registro de las imágenes iniciales y/o patología cuando se encuentre disponible	Cualitativa ordinal	1. N1a 2. N1b 3. N2a 4. N2b 5. N3a 6. N3b
Metástasis a distancia	Evaluación clínica, imaginológica y de laboratorio del compromiso metastásico a distancia. Tomado de las valoraciones inicial y de control por oncología (Clasificación TNM)	Cualitativa ordinal	1. Sin evidencia de metástasis a distancia 2. M1a: Metástasis a piel, tejido subcutáneo o ganglios linfáticos a

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
			distancia, LDH en suero normal 3. M1b: Metástasis a pulmón, LDH en suero normal 4. M1c: Metástasis a otras vísceras, LDH normal o metástasis a distancia con LDH elevada
Órganos con compromiso metastásico	Evaluación clínica/ imaginológica del número de órganos/sistemas con compromiso metastásico a distancia. Tomado de las valoraciones inicial y de control por oncología	Cualitativa ordinal	1. Ninguno 2. 1-2 3. >3
Etapas clínicas	Clasificación por etapa clínica al momento del diagnóstico (Clasificación TNM)	Cualitativa ordinal	1. IIIA 2. IIIB 3. IIIC 4. IV
Características patológicas			
Sitio anatómico	Caracterización del sitio de obtención de la muestra del tumor	Categoría nominal	1. Cabeza y cuello 2. Tronco 3. Extremidades 4. Mucosa
Subtipo mayor del melanoma	Caracterización de la presentación tumoral de acuerdo a sitio anatómico y patrón de crecimiento	Categoría nominal	1. De extensión superficial 2. Nodular 3. Lentigo maligno 4. Acral lentiginoso 5. De mucosa 6. Uveal o conjuntival 7. Nevoide 8. Desmoplásico 9. Sarcoma de células claras 10. Melanoma dérmico solitario
Máximo espesor tumoral	Caracterización del área de mayor espesor tumoral identificado en el espécimen de biopsia en tumor primario o metastásico. Valorado por estudio de patología del INC.	Cuantitativa continua	Reporte en mm
Nivel anatómico	Descripción del nivel anatómico de invasión tumoral identificado en el espécimen de biopsia de piel en tumor primario o metastásico. Valorado por estudio de patología del INC	Cualitativa ordinal	1.-Nivel 1: Melanoma confinado a la epidermis. 2.-Nivel 2: Invasión a la dermis papilar. 3.-Nivel 3: Invasión extendida a la unión de la dermis papilar y reticular 4.-Nivel 4: Invasión más allá de la dermis reticular 5.-Nivel 5: Invasión a la grasa subcutánea
Ulceración	Descripción del estado de ulceración tumoral identificado la biopsia del tumor primario. Valorado por estudio de patología del INC	Cualitativa nominal	1- Ausente 2- Presente

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Tasa mitótica	Descripción del número de mitosis por mm ² en las células tumorales de la biopsia del tumor primario o metastásico valorado por estudio de patología del INC	Cuantitativa continua	Reporte en número de mitosis /mm ²
Invasión linfo-vascular	Presencia de tumor al interior de los vasos linfáticos, venas y arterias. Valorado por estudio de patología del INC.	Cualitativa nominal	1.No 2.Si
S-100	Valoración inmunohistoquímica de la expresión de la proteína S-100 en el núcleo de las células tumorales en la biopsia del tumor primario o metastásico, valorado por estudio de patología del INC.	Cualitativa nominal	1. Negativo 2. Positivo 3. No registra
Melan – A	Valoración inmunohistoquímica de la expresión de la proteína Melan-A a nivel citoplasmático en las células del tumor en el espécimen de biopsia tumor primario o metastásico. Valorado por estudio de patología del INC.	Cualitativa nominal	1. Negativo 2. Positivo 3. No registra
HMB-45	Valoración inmunohistoquímica de la expresión de HMB-45 a nivel citoplasmático en las células del tumor en el espécimen de biopsia tumor primario o metastásico. Valorado por estudio de patología del INC	Cualitativa nominal	1. Negativo 2. Positivo 3. No registra
Mutación V600 en gen BRAF	Valoración del gen BRAF mediante técnica cobas (RT-PCR). Valorado en el INC servicio de genética	Cualitativa Nominal	1. Mutación V600 no detectada 2. Mutación V600E detectada 3. Mutación V600K detectada 4. No realizada o no realizable
Nivel de expresión de HLA-I en el tumor	Valoración del patrón de expresión de moléculas HLA-I en el espécimen de la biopsia tumoral primaria o metastásica. Valorado por estudio de Inmunohistoquímica.	Cualitativa nominal	1. No alterado 2. Alterado
Pérdida de heterocigosis (LOH) en el tumor	Valoración de la ocurrencia de LOH en 6p21.3 en la biopsia tumoral primaria o metastásica. Valorado por análisis de micro satélites	Cualitativa nominal	1. No LOH 2. LOH en menos de tres marcadores 3. Pérdida de Haplotipo 4. Pérdida del brazo corto del cromosoma 6
Localización del infiltrado tumoral:	Localización del infiltrado tumoral por inmunohistoquímica en biopsia tumoral primaria o metastásica. Valorado por estudio de Inmunohistoquímica.	Cualitativa nominal	1. Intra-tumoral 2. Peri-tumoral 3. No-infiltrado
Densidad del infiltrado tumoral	Densidad de las poblaciones CD3+ y LTCD8+T intra-tumoral y peri-tumoral.	Cualitativa nominal	1. 0-25% Baja 2. 25-70% Intermedia 3. 70-100% alta

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Características del Infiltrado tumoral	Valoración de la presencia de Linfocitos T reguladores (LT Reg) y de células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC).	Cualitativa nominal	<ol style="list-style-type: none"> 1. LT Reg (+) MDSC(+) 2. LT Reg (+) MDSC(-) 3. LT Reg (-) MDSC(+) 4. LT Reg (-) MDSC(-)
Valoración de la expresión de CTLA-4, PD1 y PDL1 en los linfocitos infiltrantes de tumor	Intensidad de tinción		<ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Débilmente positivo 3. negativo
	patrón de tinción y		<ol style="list-style-type: none"> 1. Nuclear 2. Citoplasmática 3. De membrana
	Localización de las células CTLA-4 (+), PD1 (+) o PD-L1 (+).		<ol style="list-style-type: none"> 1. Intra-tumoral 2. Peri-tumoral
Valoración de la expresión de PDL1 en el tumor	y PDL1 en las células tumorales mediante técnicas moleculares como Inmunohistoquímica		<ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Débilmente positivo 3. negativo
Valoración de la expresión de HLA-G en los linfocitos infiltrantes de tumor	Determinar la expresión de HLA-G en el infiltrado tumoral mediante técnicas moleculares como Inmunohistoquímica		<ol style="list-style-type: none"> 1. Positivo 2. Débilmente positivo 3. negativo
Características paraclínicas			
Deshidrogenasa láctica en suero	Medición de la concentración de deshidrogenasa láctica en suero, reportada en la primera cita de evaluación por oncología, y todas las mediciones realizadas durante el tratamiento reportadas en controles de oncología del INC.	Cuantitativa continua	U/L
Relación deshidrogenasa láctica medida en suero / valor límite superior normal	Estimación del incremento en la medición de la deshidrogenasa láctica en relación al valor límite superior normal reportado por el laboratorio. Estudios realizados en el INC	Cuantitativa continua	
Leucocitos	Recuento total de leucocitos reportado en cuadro hemático evaluado en primera consulta de oncología y otros recuentos realizados durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Cuadro hemático automatizado de tercera generación realizado en INC.	Cuantitativa continua	Células/milímetro cúbico
Neutrófilos	Recuento total de neutrófilos reportado en cuadro hemático evaluado en primera consulta de oncología y otros recuentos realizados durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Cuadro hemático automatizado de tercera generación realizado en INC.	Cuantitativa continua	Células/milímetro cúbico

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Hemoglobina (HB)	Medición de hemoglobina reportado en cuadro hemático evaluado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Cuadro hemático automatizado de tercera generación realizado en INC.	Cuantitativa continua	Gramos/decilitro
Hematocrito (HCTO)	Medición de hemoglobina reportado en cuadro hemático evaluado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Cuadro hemático automatizado de tercera generación realizado en INC.	Cuantitativa Continua	Porcentaje
Plaquetas	Recuento total de plaquetas reportado en cuadro hemático evaluado en primera consulta de oncología y otros recuentos realizados durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Cuadro hemático automatizado de tercera generación realizado en INC.	Cuantitativa Continua	Células/milímetro cúbico
Glucemia	Medición de concentración de glicemia en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica enzimática.	Cuantitativa continua	Gramos/decilitro
Creatinina	Medición de concentración de creatinina en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Miligramos/decilitro
Transaminasa Oxaloacética (TGO)	Medición de concentración de transaminasa oxaloacética en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica enzimática.	Cuantitativa continua	Unidades internacionales/litro
Transaminasa pirúvica (TGP)	Medición de concentración de transaminasa pirúvica en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica enzimática.	Cuantitativa continua	Unidades internacionales/litro
Fosfatasa alcalina (FA)	Medición de concentración de fosfatasa alcalina en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica enzimática.	Cuantitativa continua	Miligramos/decilitro

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Bilirrubina total	Medición de concentración de bilirrubina total en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Milimoles/Litro
Bilirrubina indirecta	Medición de concentración de bilirrubina indirecta en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Milimoles/Litro
Sodio en plasma	Medición de concentración de sodio plasmático en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Milimoles/Litro
Potasio en plasma	Medición de concentración de sodio plasmático en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Milimoles/Litro
Magnesio en plasma	Medición de concentración de magnesio plasmático en suero reportado en primera consulta de oncología y otras mediciones realizadas durante el tratamiento reportado en las citas de control de oncología del INC. Realizado en INC por técnica colorimetría.	Cuantitativa continua	Milimoles/Litro
Características de la respuesta clínica durante el seguimiento			
Intensidad de dosis relativa	Cantidad del fármaco administrado por unidad de tiempo dividido cantidad de droga planeada por unidad de tiempo multiplicado por 100	Cuantitativo continua	Porcentaje
Respuesta clínica	Valoración clínica del tamaño tumoral post inmunoterapia, mediante criterios Resist 1.0. Valorado por los servicios de oncología clínica, servicio de seno y tejidos blandos y/o radiología.	Cualitativo Ordinal	1. Completa 2. Parcial 3. Estacionaria 4. Progresión
Progresión locoregional	Definición, en caso de documentarse progresión locoregional de la enfermedad, del sitio de progresión	Cualitativo Nominal	1. Locoregional 2. No aplica
Progresión sistémica	Sitio de progresión donde se documentó progresión sistémica de la enfermedad.	Cualitativo Nominal	1. Ósea 2. Pulmonar 3. Hepática 4. Cerebral 5. No aplica 6. Otra
Características toxicidad			
Toxicidad cardíaca	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema cardiovascular post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NYHA. Valorado por el servicio de	Cualitativa nomina	1. Si 2. No

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
	oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.		
Anemia	Valoración paraclínicas de los efectos adversos a nivel del sistema hemático post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Leucopenia	Valoración paraclínica de los efectos adversos a nivel del sistema hemático post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Neutropenia	Valoración paraclínica y clínica de los efectos adversos a nivel del sistema hemático post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Trombocitopenia	Valoración paraclínica de los efectos adversos a nivel del sistema hemático post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Nausea	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema gastrointestinal post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Vómito	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema gastrointestinal post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Diarrea/colitis	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema gastrointestinal post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Mucositis	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema gastrointestinal post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Toxicidad hepática bilirrubinas	Valoración clínica y paraclínica de los efectos adversos a nivel hepática post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nomina	1. Si 2. No

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
	mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.		
Toxicidad hepática fosfatasa alcalina	Valoración clínica y paraclínica de los efectos adversos a nivel hepática post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Toxicidad hepática transaminasas	Valoración clínica y paraclínica de los efectos adversos a nivel hepática post administración de la inmunoterapia mediante los criterios de NCI v3. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Toxicidad renal creatinina	Valoración clínica y paraclínica de los efectos adversos a nivel renal post administración de la inmunoterapia mediante química sanguínea de la función renal (creatinina). Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Astenia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Alopecia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipernatremia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hiponatremia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipokalemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Hiperkalemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipomagnesemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipermagnesemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipocalcemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipercalcemia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Reacción alérgica	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Anafilaxia	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de la inmunoterapia mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nomina	1. Si 2. No
Otras toxicidades	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel general post administración de los agentes quimioterapéuticos mediante criterios de NCI v4. Valorado por el servicio de oncología clínica del INC en cada una de las consultas de seguimiento.	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Conducta a seguir	Valoración del efecto de cada una de las toxicidades relatada sobre el suministro de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Ninguna 2. Descontinua 3. Interrumpir 4. Reducción de dosis

EVALUACIÓN DEL INMUNOFENOTIPO TUMORAL EN MELANOMA COMO MARCADOR DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE BLOQUEO DE LOS PUNTOS DE CONTROL INMUNE

Zuluaga, Mejía, Rincón

Nombre Variable	Definición Operativa	Naturaleza	Medición
Neumonitis	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema pulmonar post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipotiroidismo	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema endocrino post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Hipertiroidismo	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema endocrino post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Insuficiencia adrenal	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema endocrino post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Diabetes mellitus tipo 1	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema endocrino post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Miastenia gravis	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Síndrome Guillan Barre	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Neuropatía periférica	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Meningitis aséptica	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Encefalitis	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia	Cualitativa nominal	1. Si 2. No
Mielitis transversa	Valoración clínica de los efectos adversos a nivel del sistema neurológico post administración de la inmunoterapia		1. Si 2. No
Consecuencias	Valoración del estado de salud a causa de la toxicidad descrita	Cualitativa nominal	0. Ninguna 1. Hospitalización

Tabla 3. Características de seguimiento del paciente

Características del seguimiento del paciente			
Fecha de último seguimiento	Fecha en la cual se conoció el estado vital de la paciente.	No aplica	dd/mm/aaaa
Estado vital	Estado vital de la paciente en la última fecha de seguimiento	Cualitativa nominal	1. Viva sin enfermedad 2. Viva con enfermedad 3. Muerta por la enfermedad 4. Muerta por otra causa

VI. Conducción del estudio

a. Sitio de investigación

El presente estudio requiere la revisión de historias clínicas del programa SAP dentro de las instalaciones del INC. Así mismo, requiere la obtención de material histopatológico del banco de tumores y el procesamiento de las mismas en el laboratorio del Grupo de Investigación en Biología del Cáncer.

b. Manejo de sustancias o especímenes biológicos

La obtención del material histopatológico a partir del banco de tumores se realizará mediante solicitud escrita, en la que se incluirá el nombre e identificación del paciente; posteriormente serán trasladados al laboratorio del Grupo de Investigación en Biología del Cáncer del INC.

c. Archivo de datos y sistematización

La revisión de historias clínicas se realizará a partir de datos confidenciales del servicio de oncología clínica y banco de tumores, con posterior registro de la información en el formulario electrónico de la plataforma REDcap. El formulario será diseñado exclusivamente para este estudio y será custodiado por la unidad de análisis de datos del INC.

d. Consideraciones éticas

El presente estudio se considera éticamente viable, ajustado a la declaración de Helsinki, ya que se apoya en diseños aceptados y con participación de profesionales idóneos.

Según los parámetros establecidos en el ámbito nacional por la resolución 8430 de 1993, expedida por el ministerio de la protección social, donde se establecen normas de investigación científicas, técnicas y administrativas, se considera una investigación sin riesgo ya que es un estudio descriptivo sin intervenciones fisiológicas.

Teniendo en cuenta el contenido de la resolución 2378 de 2008 expedida por el ministerio de la protección social de Colombia, se declara que su contenido no aplica a este estudio.

Para el acceso a las muestras de histopatología, se contará con el consentimiento informado del paciente que se presentará en el formato actualizado “INV-P01-F-11 Sometimiento Consentimiento Informado”.

El proyecto también será presentado ante el Comité de Investigación y Ética del INC y de la FSFB.

e. Seguridad

No aplica

f. Consideraciones ambientales

No aplica

g. Confidencialidad

Para garantizar la confidencialidad, se asignará a cada paciente un número consecutivo no relacionado con la identificación en la historia clínica. Los números originales solo serán empleados para la búsqueda de casos y verificación de la calidad de la información. Una vez los resultados sean sometidos a publicación se mantendrá oculta la identidad del individuo.

Solo el equipo investigador tendrá acceso a la base de datos durante las diferentes etapas y procesos del estudio.

h. Aseguramiento y control de calidad

El presente estudio contará con el apoyo del grupo de monitoria de investigación del INC para realizar la verificación de la calidad de la información.

VII. Resultados/ productos esperados

- a. Tabla 4. Relacionados con la generación de conocimiento y/o nuevos desarrollos tecnológicos

Resultado/Producto esperado	Indicador	Beneficiario
Artículo publicado en revistas indexadas (ISI)	1 (un) artículo	<ul style="list-style-type: none"> Comunidad científico-académica relacionada con el tema en el ámbito nacional Instituto Nacional de Cancerología
Artículo publicado en la revista Colombiana de Cancerología	1 (un) artículo	<ul style="list-style-type: none"> Comunidad científico-académica relacionada con el tema en el ámbito nacional Instituto Nacional de Cancerología

- b. Tabla 5. Conducentes al fortalecimiento de la capacidad científica nacional

Resultado/Producto esperado	Indicador	Beneficiario
Formación de recurso humano a nivel profesional o de postgrado	1 (un) Estudiante de posgrado	<ul style="list-style-type: none"> Instituto Nacional de Cancerología Universidad de origen del estudiante Equipo investigador

- c. Tabla 6. Dirigidos a la apropiación social del conocimiento

Resultado/Producto esperado	Indicador	Beneficiario
Ponencias en eventos científicos internacionales	1 (una) ponencia	<ul style="list-style-type: none"> Investigadores en la temática Agremiaciones de profesionales Sociedades científicas Instituciones de Salud Universidades / Entes académicos Entes gubernamentales / Estado Comunidad general
Ponencias en eventos científicos nacionales	1 (una) ponencia	<ul style="list-style-type: none"> Investigadores en la temática Agremiaciones de profesionales Sociedades científicas Instituciones de Salud Universidades / Entes académicos Entes gubernamentales / Estado Comunidad general

d. Tabla 7. Impacto esperado a partir del uso de los resultados

Impacto esperado	Plazo (años) después de finalizado el proyecto: corto (1-4), mediano (5-9), largo (10 o más)	Indicador verificable	Supuestos*
Clínico	Largo	Identificación de expresión HLA como factor predictivo de respuesta a inmunoterapia.	<ul style="list-style-type: none"> • Clasificar pacientes con MM o irresecable que recibirán inmunoterapias de acuerdo con su fenotipo tumoral.
Científico	Corto	Artículo científico sometido.	<ul style="list-style-type: none"> • Generación de conocimiento. • Estudio base para desarrollo de estudios prospectivos institucionales y nacionales.

VIII. Referencias

Reference List

- (1) Buchbinder EI. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. 2016 Feb.
- (2) Bristol-Myers Squibb Company. Yervoy (Ipilimumab) [package insert]. Princeton, NJ: 2013.
- (3) Bristol-Myers Squibb Company. Opdivo (Nivolumab) [package insert]. Princeton, NJ: 2015.
- (4) Merck & Co Inc. Keytruda (Pembrolizumab) [package insert]. Whitehouse Station, NJ, 2015.
- (5) Haag GM, Zoernig I, Hassel JC, Halama N, Dick J, Lang N, Podola L, Funk J, Ziegelmeier C, Juenger S, Bucur M, Umansky L, et al. Phase II trial of ipilimumab in melanoma patients with preexisting humoral immune response to NY-ESO-1. *Eur J Cancer* 2018 Feb;90:122-9.
- (6) Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010 Aug 19;363(8):711-23.
- (7) Menshawy A, Eltonob AA, Barkat SA, Ghanem A, Mniesy MM, Mohamed I, Abdel-Maboud M, Mattar OM, Elfil M, Bahbah EI, Elgebaly A. Nivolumab monotherapy or in combination with ipilimumab for metastatic melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Melanoma Res* 2018 Jun 27.
- (8) Gerson JN, Ramamurthy C, Borghaei H. Managing adverse effects of immunotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2018 May;16(5):364-74.
- (9) Carosella ED, Ploussard G, LeMaout J, Desgrandchamps F. A Systematic Review of Immunotherapy in Urologic Cancer: Evolving Roles for Targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. *Eur Urol* 2015 Aug;68(2):267-79.
- (10) Rodriguez JA, Galeano L, Palacios DM, Gomez C, Serrano ML, Bravo MM, Combata AL. Altered HLA class I and HLA-G expression is associated with IL-10 expression in patients with cervical cancer. *Pathobiology* 2012;79(2):72-83.
- (11) Rajendra S, Ackroyd R, Karim N, Mohan C, Ho JJ, Kutty MK. Loss of human leucocyte antigen class I and gain of class II expression are early events in carcinogenesis: clues from a study of Barrett's oesophagus. *J Clin Pathol* 2006 Sep;59(9):952-7.
- (12) Zeestraten EC, Reimers MS, Saadatmand S, Goossens-Beumer IJ, Dekker JW, Liefers GJ, van den Elsen PJ, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br J Cancer* 2014 Jan 21;110(2):459-68.
- (13) LeMaout J, Zafaranloo K, Le DC, Carosella ED. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J* 2005 Apr;19(6):662-4.
- (14) Yan WH. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011 Mar;11(1):76-89.
- (15) Ascierto PA, Capone M, Urba WJ, Bifulco CB, Botti G, Lugli A, Marincola FM, Ciliberto G, Galon J, Fox BA. The additional facet of immunoscore: immunoprofiling as a possible predictive tool for cancer treatment. *J Transl Med* 2013 Mar 3;11:54.

- (16) Koliijn K, Verhoef EI, Smid M, Bottcher R, Jenster GW, Debets R, van Leenders GJ. Epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer demonstrates enhanced immune evasion marked by IDO1 expression. *Cancer Res* 2018 Jun 19.
- (17) Ozcan M, Janikovits J, von Knebel DM, Kloor M. Complex pattern of immune evasion in MSI colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2018;7(7):e1445453.
- (18) Steven A, Seliger B. The Role of Immune Escape and Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 2018 Mar;13(1):16-21.
- (19) Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang JY, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front Pharmacol* 2018;9:536.
- (20) McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, Rowan AJ, Watkins TBK, Wilson GA, Birkbak NJ, Veeriah S, Van LP, Herrero J, Swanton C. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* 2017 Nov 30;171(6):1259-71.
- (21) Constanza Pardo Ramos, Ricardo Cendales Duarte. Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia, 2007-2011, 1 ed 2018.
- (22) Park HS, Cho U, Im SY, Yoo CY, Jung JH, Suh OJ, Choi HJ. Loss of Human Leukocyte Antigen Class I Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Advanced Breast Cancer. *J Pathol Transl Med* 2018 Nov 14.
- (23) Imani R, Seyedmajidi M, Ghasemi N, Moslemi D, Shafae S, Bijani A. HLA-G Expression is Associated with an Unfavorable Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018 Sep 26;19(9):2527-33.
- (24) Murdaca G, Calamaro P, Lantieri F, Pigozzi S, Mastracci L, Grillo F, Magnani O, Ceppa P, Puppo F, Fiocca R. HLA-G expression in gastric carcinoma: clinicopathological correlations and prognostic impact. *Virchows Arch* 2018 Oct;473(4):425-33.
- (25) Zhao KL, Liu J, Jiang WN, Hao JH. [Prognostic value of tumor infiltration immune cells in pancreatic cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2018 Jun 1;56(6):464-70.
- (26) Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002 Feb;12(1):3-13.
- (27) Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010 Mar;46(4):765-81.
- (28) Pozzobon F, Acosta A, Carreño A, Fierro E. Características del melanoma cutáneo primario en el INC 2006-2010. *rev colomb cancerol* 2013 May 7;17(3):111-8.
- (29) Gilchrist BA, Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999 Sep;4(1):35-40.
- (30) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005 Sep;41(14):2040-59.
- (31) Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 2012 Apr;22(2):114-22.

- (32) Silva IP, Long GV. Systemic therapy in advanced melanoma: integrating targeted therapy and immunotherapy into clinical practice. *Curr Opin Oncol* 2017 Nov;29(6):484-92.
- (33) Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014 Feb;14(2):135-46.
- (34) Brichard V, Van PA, Wolfel T, Wolfel C, De PE, Lethe B, Coulie P, Boon T. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 1993 Aug 1;178(2):489-95.
- (35) Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg SA. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996 Mar 1;183(3):1185-92.
- (36) Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003 Apr;83(2):337-76.
- (37) Aptsiauri N, Cabrera T, Mendez R, Garcia-Lora A, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:123-31.
- (38) Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van BN, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, et al. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998 Dec;52(6):520-9.
- (39) Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 1997;27(2):95-102.
- (40) Garcia-Lora A, Algarra I, Collado A, Garrido F. Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 2003 Jun;30(3):177-83.
- (41) Jaiswal S, Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Macrophages as mediators of tumor immunosurveillance. *Trends Immunol* 2010 Jun;31(6):212-9.
- (42) Laoui D, Van OE, De BP, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol* 2014;5:489.
- (43) Savage PA, Leventhal DS, Malchow S. Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2014 May;259(1):245-58.
- (44) Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J Clin Invest* 2015 Sep;125(9):3356-64.