



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Correlación de la expresión de PD-L1 en muestras
citológicas y de biopsia en cáncer de pulmón.**

**Correlation of PD-L1 expression in cytological samples and
biopsy in lung cancer.**

Autor: D. Eric Bismar Ynfante Peralta

Director: Dr. Javier Gómez Román

Co-director: Dr. Javier Martín López

Santander, Junio 2018

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo representa los frutos de años de mucho esfuerzo. Representa la constancia y paciencia de personas a las que hoy puedo llamar familia; en especial a mi madre, a la que agradeceré eternamente por ser mi principal motivación.

Al equipo de trabajo del IES Cantabria, sobre todo al departamento de Anatomía Patológica y Citodiagnóstico, por haber puesto todo de su parte en mi adaptación en este cuando era un sistema educativo nuevo para mí.

Un agradecimiento particular al Dr. Gómez Román del servicio de Anatomía Patológica de Valdecilla (HUMV) por aceptar colaborar en este proyecto. Ha sido mi forma de agradecer a su especialidad el haberme permitido encontrarme con algo tan especial como la Medicina.

INDICE

INDICE	2
RESUMEN	3
1. INTROUCCI3N	4
2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	5
2.1. Objetivos generales	5
2.2. Objetivos espec3ficos	5
3. MARCO TE3RICO	6
3.1. Inmunolog3a tumoral	6
3.2. Reconocimiento inmunol3gico y c3lulas implicadas	7
3.3. Control inmunol3gico o “immune checkpoints”	9
3.3.1. PD-1 y PD-L1	9
3.4. Mecanismo de escape inmunol3gico en el c3ncer de pulm3n.....	11
3.5. Inmunoterapia del c3ncer de pulm3n	14
3.5.1. Vacunas frente al c3ncer o terapia pasiva	14
3.5.2. Inhibidores de los puntos de control o terapia activa.....	14
3.6. Expresi3n de PD-L1	20
3.6.1. La inmunohistoqu3mica (IHQ).....	20
3.6.2. Anticuerpos comercializados frente a PD-L1	25
3.6.4. Recomendaciones generales	28
4. PRESENTACI3N DE VARIABLES	29
4.1. Definici3n de variables.....	29
5. MATERIAL Y M3TODOS	30
5.1. Poblaci3n	30
5.2. Consideraciones 3ticas	30
5.3. Muestra	30
5.4. Criterios de inclusi3n y de exclusi3n	30
5.5. Variables y su operacionalizaci3n.....	31
5.6. T3cnica de detecci3n de expresi3n de PD-L1 validada.	31
5.7. Procesamiento de los datos.....	33
5.8. Plan de an3lisis.....	34
5.9. Limitaciones de la investigaci3n.....	35
6. PRESENTACI3N Y AN3LISIS DE LOS RESULTADOS	36
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAF3CAS	41

RESUMEN

El tratamiento del Cáncer de Pulmón no Microcítico (CPNM) tiene un futuro prometedor gracias a las nuevas posibilidades, entre ellas la inmunoterapia (p.e. anticuerpos monoclonales contra PD-1 y PD-L1), la cual requiere identificar a aquellos pacientes que se podrían beneficiar de ella. En los estudios que han permitido aprobar esta terapia se han utilizado muestras de tejido (histología). En este estudio hemos intentado comprobar la facticidad de la determinación de la expresión de PD-L1 (proteína implicada en la inhibición de la respuesta inmune celular) en muestras citológicas de CPNM obtenidas mediante Ecobroncoscopia Lineal (EBUS), una técnica poco invasiva, pero con el inconveniente de que el número de células disponibles para el estudio es más bajo. Partimos de una población de 87 casos de CPNM susceptibles de valoración de PD-L1 en EBUS, de los cuáles 16 cumplían criterios para formar parte de la muestra (N). A pesar de que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos en biopsia y citología según el análisis estadístico, recomendamos emplear un número "N" mayor para analizar la concordancia entre ambas pruebas.

ABSTRACT

The treatment of Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) has a promising future because the new possibilities, including immunotherapy (e.g. monoclonal antibodies against PD-1 and PD-L1), which requires identifying those patients who could benefit from it. In the studies that have allowed to approve this therapy, tissue samples have been used (biopsy). In this study we have tried to verify the feasibility of the determination of the expression of PD-L1 (protein involved in the inhibition of the cellular immune response) in cytological samples of NSCLC obtained by EBUS, a minimally invasive technique, but with the disadvantage that the number of available cells is low. We started from a population of 87 cases of NSCLC susceptible to PD-L1 assessment in Endobronchial Ultrasound (EBUS), of which 16 met criteria to be part of the sample (N). Although there are no significant differences in the results obtained in biopsy and cytology according to the statistical analysis, we recommend using a greater "N" number to analyze the agreement between both tests.

Keywords: PD-L1, inmunohistoquímica, bloque celular, inmunoterapia.

1. INTROUCCIÓN

Las Cifras del Cáncer en España es un informe anual editado por la Sociedad Española de Oncología Médica que recoge los datos de incidencia, mortalidad, supervivencia y prevalencia de cáncer en España. Según este informe, el cáncer de pulmón es el cáncer de mayor incidencia (1.824.701 casos en 2012), seguido por el cáncer de mama, colorrectal, próstata, estómago e hígado (1). Es el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado en varones, según los datos de 2015 publicados por REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer). En mujeres ocupa el cuarto puesto (1). La tasa de supervivencia a los 5 años es del 18 % (15 % los hombres y un 21 % las mujeres) y depende de varios factores que incluyen el subtipo de cáncer de pulmón y el estadio de la enfermedad. La variante “no microcítica” (CPNM) representa el 80-85% (2). Más del 80% de los pacientes con CPNM se encuentran en estadio avanzado/metastásico al momento del diagnóstico (3).

La terapia del CPNM avanzado tradicionalmente se ha centrado en la combinación de dos quimioterápicos de platino en pacientes con un estado general apropiado; la gran variabilidad de los mecanismos de resistencia de las células tumorales ha respaldado esta práctica, con el riesgo que supone para los pacientes (toxicidad). Sin embargo, las nuevas terapias centradas en desbloquear la respuesta inmune tumoral, es decir, las inmunoterapias, han demostrado ofrecer muy buenos resultados en casos en los que la terapia clásica no ha sido efectiva, y se suele emplear como primera línea en ciertas situaciones (4). Entre estas terapias encontramos los anticuerpos anti ligado 1 de las proteínas de muerte celular programada (anti-PD-L1), implicadas en la inhibición de los puntos de control o “*checkpoints*” inmunológicos. La expresión de estas proteínas es analizada mediante inmunohistoquímica (IHQ) y sirve para predecir la respuesta al tratamiento (5,6).

La norma es emplear histología para su determinación, pero más de un tercio de los pacientes son diagnosticados sólo con citología (3,6). Es justamente esto lo que ha motivado este estudio, la creciente necesidad de emplear técnicas menos agresivas en nuestra práctica clínica diaria, sobre todo cuando hablamos de patologías que afectan a pacientes pluripatológicos.

2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Diversos ensayos empleando IHQ en material histológico han permitido establecer puntos de cortes de positividad dependientes de la proporción de células tumorales marcadas mediante esta técnica, y del anticuerpo empleado. Sin embargo, existe poca literatura sobre si es posible extrapolar estos datos cuando se emplea la citología como medio de obtención de la muestra, aunque cada vez son más los estudios que avalan esta práctica.

2.1. Objetivos generales

- Validar el empleo de muestras citológicas obtenidas mediante EBUS en pacientes diagnosticados de Cáncer de Pulmón no Microcítico y que podrían beneficiarse de inmunoterapia anti-PD-L1.
- Reducir el número de procedimientos diagnósticos invasivos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar si el número de células obtenidas para el análisis citológico es suficiente.
- Determinar la proporción de células que expresan PD-L1.
- Determinar las condiciones ideales del procesamiento de la muestra citológica.
- Comparar los resultados con los obtenidos mediante histología.

3. MARCO TEÓRICO

Se define como inmunoterapia a cualquier terapia que interactúe con el sistema inmune (SI) del huésped para tratar el cáncer. Como opción ha existido desde antes de la quimioterapia citotóxica (6), la cual ataca principalmente a las células con alto índice proliferativo. Se diferencia de las terapias dirigidas en que éstas interfieren en los eventos moleculares claves para el crecimiento y la invasión tumoral (7).

Históricamente el CPNM era considerado como “no inmunógeno”, eso es, incapaz de inducir destrucción tumoral por vía inmunológica. Esta teoría estaba basada en los intentos fallidos de modular la respuesta inmune frente a este cáncer mediante el empleo de interleucina 2 (IL-2), interferón, y bacilos Calmette-Guerin (BCG). Gracias a los avances en el conocimiento del sistema inmune y al empleo de nuevas tecnologías que permiten el desarrollo de fármacos, nuevas terapias que mejoran la acción antitumoral inmunológica han emergido como herramientas poderosas en el manejo del CPNM avanzado.

3.1. Inmunología tumoral

Es ampliamente aceptado que el desarrollo del cáncer se produce por la acumulación de alteraciones que van desde cambios epigenéticos a mutaciones genéticas, y que éstas acaban diferenciando a las células cancerosas de las normales tanto genética- como fenotípicamente. Dentro de los cambios fenotípicos incluimos aquellos que afectan a los antígenos de la superficie celular y que hacen posible que el sistema inmune reaccione contra ellas. Hoy en día es posible describir cómo los tumores son capaces de escapar del sistema inmune y es lo conocemos como inmunoedición o “*immunoediting*”.

En este contexto, entre los objetivos de la inmunoterapia se incluyen (7):

- A. Ayudar en el reconocimiento del cáncer como extraño.
- B. Estimular la respuesta inmune.
- C. Evitar la inhibición del SI que permite la tolerancia del desarrollo tumoral.

3.2. Reconocimiento inmunológico y células implicadas

Aun siendo de la misma especie, se produce inmunorespuesta en el trasplante de órganos. Este hecho implica que el sistema inmune distingue los antígenos propios de los extraños. Las células T se encargan de ello. El antígeno debe ser presentado a la célula T y de eso se encargan las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas (CD).

Las CDs se encargan de fagocitar los antígenos, los procesan convirtiéndolos en péptidos, y luego los presentan a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (7). Como resultado de dicha presentación, las células T, que poseen receptores específicos para los antígenos reconocidos, se activan en coordinación con receptores coestimuladores (CD28 y 4-1 BB) que permiten una activación eficaz de las células T CD8+ nativas, y se produce entonces la liberación de moléculas proinflamatorias como IL-2 y IFN-gamma. En ausencia de estas señales coestimuladoras se produce un estado de anergia o tolerancia. El receptor más importante es CD28, el cual se une a B7-1 y B7-2 (CD80/86) presentes en las células dendríticas. Esta señal es regulada por moléculas agonistas, sobre las cuales no haremos referencia, e inhibitorias, conocidas como moléculas de control inmunológico o *“immune checkpoints”*; un ejemplo de éstas son las que modulan la muerte celular programada, o PD-1. La regulación se produce en la célula presentadora de antígeno y en la célula T (8).

Las células T citotóxicas (Linfocitos T CD8+) son las mayormente implicadas en este proceso, aunque también participan los linfocitos T CD4+ a través de la estimulación de las células B, que se encargan de la producción de anticuerpos.

Todos estos mecanismos tienen como finalidad atacar a las células del cáncer (Ilustración 1) (6).

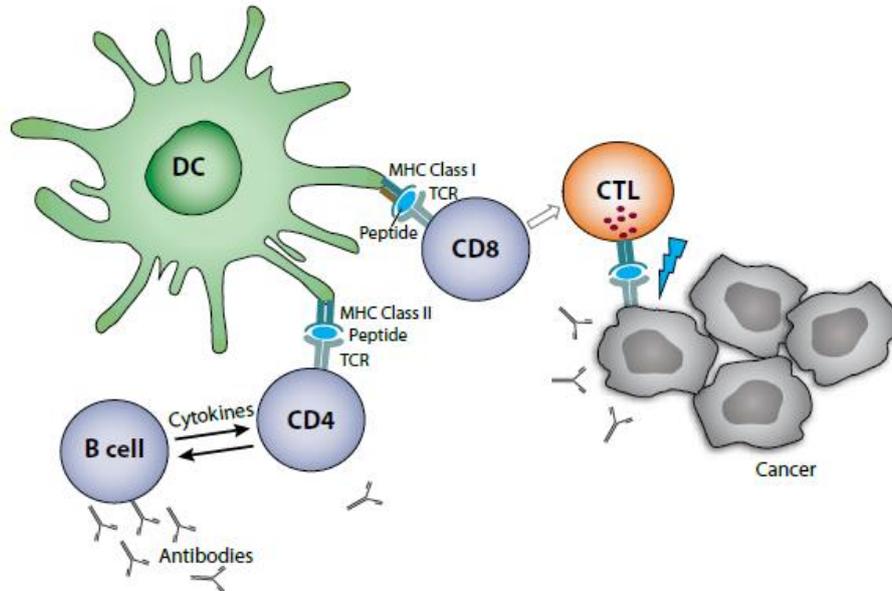


Ilustración 1. Demostración simple de cómo se produce la reacción inmune contra las células del cáncer. Es iniciada por una interacción entre los receptores de las células T (TCR, sus siglas en inglés) y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, sus siglas en inglés). Este último presenta los péptidos inmunógenos procesados. Células dendríticas (DC, sus siglas en inglés) y Linfocitos T citotóxicos (CTL, sus siglas en inglés).

La actividad citotóxica de las células T CD8+ es regulada por una serie de receptores estimuladores e inhibidores cuya expresión a su vez es regulada por citocinas. Juntos forman el complejo conocido como “sinapsis inmunológica” (Ilustración 2) (8).

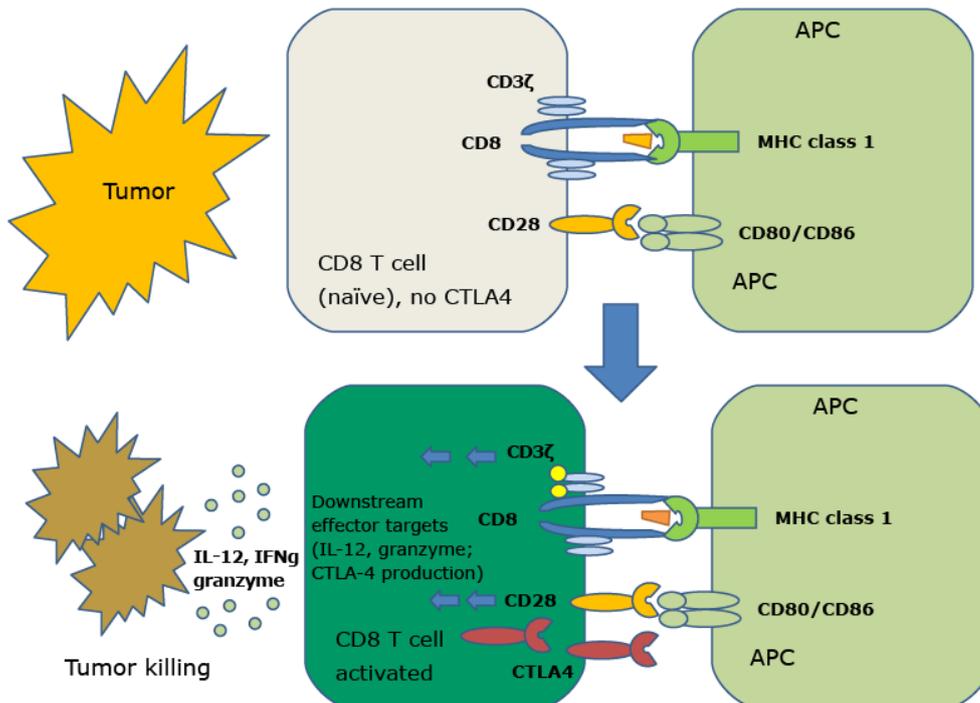


Ilustración 2. Interacción de los linfocitos T CD8+ con las células presentadoras de antígenos, así como el efecto que produce en las células tumorales a través de las citocinas.

Otras células implicadas con las células natural killer (NK). Estas células no requieren la presentación antigénica mediante el CMH para su acción citotóxica. De hecho, las células NK destruyen a células con baja expresión de CMH. Como las células T, las células NK expresan numerosas moléculas inhibitorias.

Por otro lado encontramos los macrófagos, los cuales se diferencian en al menos dos fenotipos: Los macrófagos M1, los cuales liberan IFN gamma y son responsables de la fagocitosis; y los macrófagos M2, que liberan citocinas como IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), y se encargan de regular la respuesta inflamatoria y promover la tolerancia.

3.3. Control inmunológico o “immune checkpoints”

Las células cancerosas pueden sobrevivir en pacientes inmunocompetentes debido a que son capaces de desarrollar tolerancia, lo que les permite escapar del ataque inmunológico. A pesar de que los intentos iniciales se centraban en aumentar o mejorar el SI frente al tumor (terapias linfocitarias), se ha visto que “frenando” los mecanismos de inhibición – *incluidos los “immune checkpoints”*-, se obtienen resultados prometedores. Las dos vías principalmente implicadas en este tipo de tratamiento incluyen los antígenos citotóxicos asociados a linfocitos T (CTLA-4, según siglas en inglés) y la proteína de muerte celular programada (PD-1), sobre la que indagaremos a continuación.

3.3.1. PD-1 y PD-L1.

PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, ambos son miembros de la familia B7, la cual se une a PD-1. Estas dos moléculas comparten en 37% de secuencia homóloga y surgen por la duplicación de genes. En contraposición a la expresión de PD-L2 que sólo se expresa en las células presentadoras de antígenos, PD-L1 es capaz de expresarse en varios tipos celulares como son las células T, células epiteliales y células endoteliales. Mientras que CTLA-4 juega un papel importante en la fase inicial del reconocimiento inmunológico, el control por parte de PD-L1 se produce en la parte final de la respuesta inmune, en la de inflamación tisular, regulando la función de las células T y previniendo la autoinmunidad.

Un ejemplo de cómo actúa PD-1 es el siguiente: es caso de una infección por un microorganismo, el antígeno activa a la célula T, que a su vez aumenta la expresión de PD-1 en su superficie. Además, las señales inflamatorias en los tejidos inducen la expresión de PD-L1, que previene el daño tisular colateral inhibiendo a la célula T. Es también conocido que la expresión excesiva de PD-1, típicamente inducida por la exposición crónica a un antígeno (tumoral o viral, por ejemplo), se asocia con un estado de anergia de las células T (Ilustración 3).

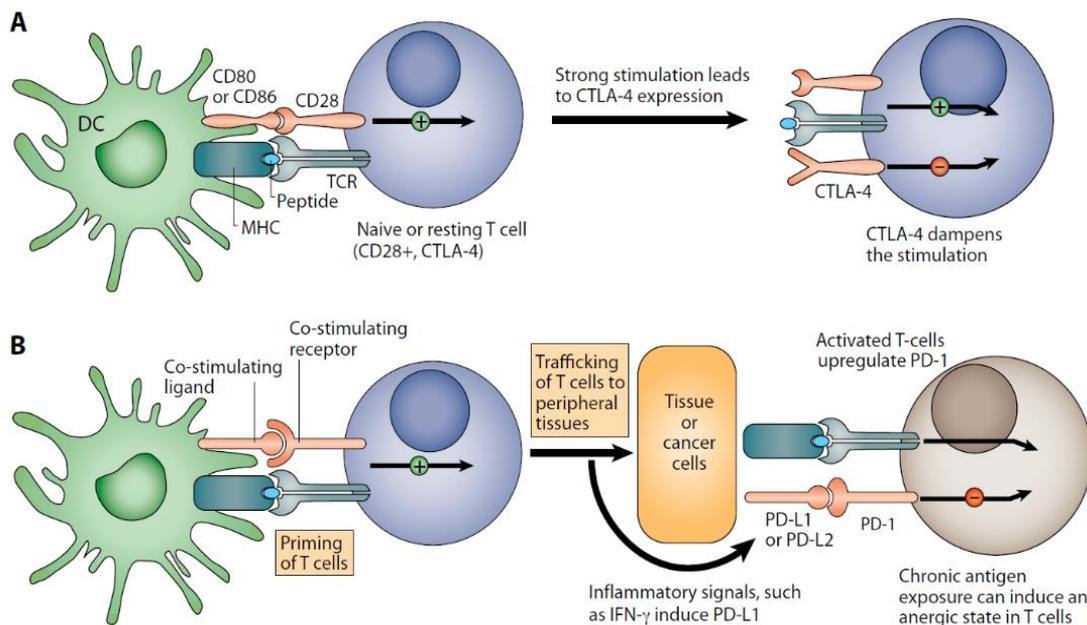


Ilustración 3. Representación de los dos principales sistemas de regulación inmunológica, PD-1 y CTLA-4.

En los tejidos afectados por el cáncer, PD-1 está sobreexpresado en los linfocitos infiltrantes de tumor (LIT), mientras que su ligando, PD-L1, se encuentra expresado en varios tipos celulares. Esta parece ser una respuesta adaptativa intrínseca mediante la cual las células tumorales intentan expresar PD-L1 para escapar de la vigilancia inmunológica ligándose a las moléculas de PD-1 expresadas en los LITs (Ilustración 4).

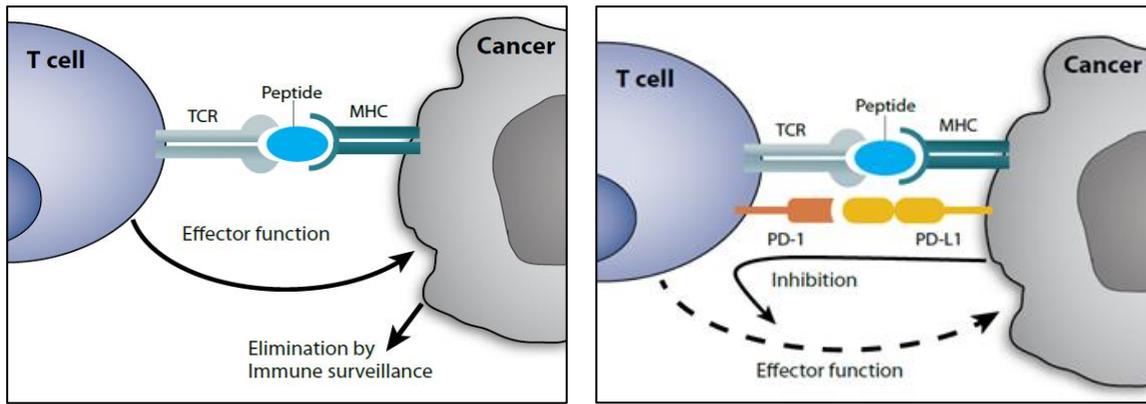


Ilustración 4. Vía de actuación frente al cáncer de la proteína de muerte celular programada (PD-1) y su ligando (PD-L1). Las células T atacan a las células tumorales a través de una función efectora (A). Sin embargo, las células cancerígenas pueden escapar del sistema de vigilancia inmune mediante la expresión de PD-L1. Los linfocitos T activados expresan PD-1. La unión de PD-L1 y PD-1 disminuyen la acción efectora de los linfocitos (B). TCR: receptor de células T, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

3.4. Mecanismo de escape inmunológico en el cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es conocido por poseer unos mecanismos de escapes muy complejos (de hecho, es el segundo por detrás del melanoma). Muchos de los cambios genéticos que se producen le permiten sortear el ataque del SI. Entre ellos destacan (6,8):

- Pérdida o alteración de la maquinaria antigénica: estos tumores pueden dejar de expresar el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1 o la mecánica intracelular requerida para el transporte de los antígenos tumorales para el posterior reconocimiento por la célula T.
- Promoción de un microambiente tolerante a la acción del SI: mediante la manipulación de las citocinas (aumentan la secreción de IL-6, IL-10, y de TGF-beta; y facilitan el consumo de la IL-2) que facilita la llegada de células capaces de inhibir la función citotóxica de las células T (células Treg y células supresoras de derivados mieloides). Estas células además pueden suprimir la proliferación de linfocitos CD4+ y CD8+.
- Sobreexpresión de PD-1 y su ligando: esto promueve el estado “exhausto” (anergia) de los linfocitos T periféricos (están bloqueados).

Algunos estudios sugieren que existe una señal oncogénica constitutiva que promueve la expresión de PD-L1 por parte de las células del tumor, no sólo mediante la inmunoección.

Como concepto general, y según la teoría más prevalente referida a este mecanismo, la forma en la que los cánceres son capaces de escapar del ataque efectuado por el SI del huésped, y que hasta ahora hemos denominado como “*cancer immunoediting*”, se puede describir en tres fases (Ilustración 5) (8):

- Fase de eliminación: consiste en una acción coordinada entre el SI innato y el adaptativo frente a los antígenos específicos del tumor con el objeto de provocar su destrucción antes de que se vuelva clínicamente aparente. Se caracteriza por la intervención de las células T, B y NK, y mediada por citocinas como el IFN alfa, IFN gamma, e IL-12. Se desconoce cuál es la secuencia exacta de actuación de dichas moléculas. Si esta fase llega a completarse, entonces el huésped permanece libre de cáncer, y la eliminación representa así el alcance completo del proceso.
- Fase de equilibrio: es el balance entre la respuesta de destrucción inmunomediada y la resistencia de algunos clones tumorales. Durante esta fase el crecimiento tumoral se previene mediante mecanismos inmunológicos. Se requieren células T, IL-12 e IFN-gamma para mantener las células tumorales en estado de latencia funcional, mientras que las células NK y moléculas que participan en el reconocimiento o función efectora de células de inmunidad innata no son necesarias; esto indica que el equilibrio es una función sólo de la inmunidad adaptativa. Es la etapa en la que ocurre la edición de la inmunogenicidad tumoral. También puede representar una etapa final del proceso de inmunoedición del cáncer y puede limitar el crecimiento de cánceres ocultos durante la vida del huésped.
- Fase de escape inmunológico: es la fase en la que los clones malignos adquieren la habilidad de evadir la respuesta inmunológica adaptada. Como consecuencia de la presión de selección inmune constante sobre células tumorales genéticamente inestables mantenidas en equilibrio, pueden surgir variantes de células tumorales que ya no son reconocidas por la inmunidad adaptativa (variantes de pérdida de antígeno o células tumorales que desarrollan defectos en el procesamiento de antígenos o

de su presentación), se vuelven insensibles a los mecanismos efectores inmunes, o inducen un estado inmunosupresor dentro del microambiente tumoral. Estas células tumorales pueden entrar en la fase de escape, en la que su crecimiento no es bloqueado por la inmunidad. Son las que emergen para causar una enfermedad clínicamente aparente.

Independientemente del mecanismo por el cual se induzca PD-L1, la expresión de PD-1 en LITs y el incremento de PD-L1 en las células cancerosas aportan indicios suficientes para considerar las terapias destinadas de forma específicas frente a estas moléculas. De hecho, esta inmunoterapia ha mostrado una eficacia clínica muy significativa en varios tipos de cánceres, incluido el cáncer de pulmón.

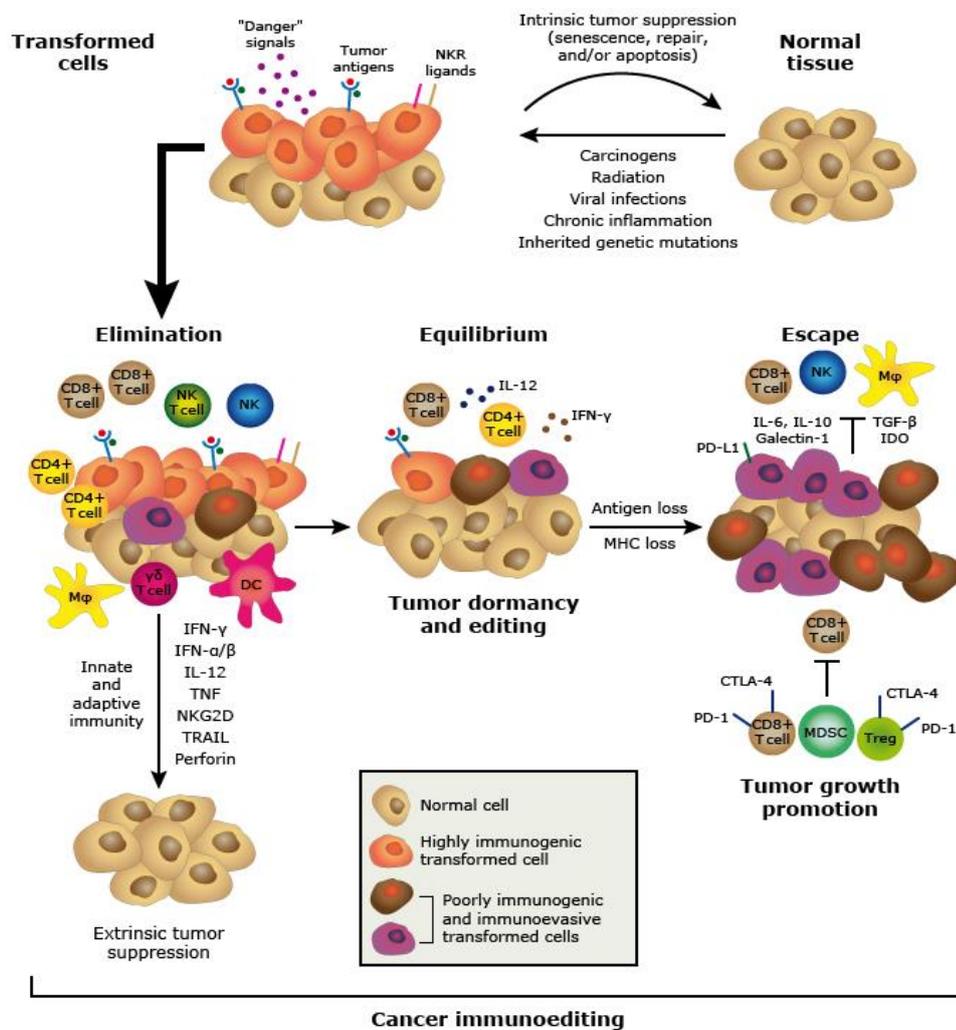


Ilustración 5. Edición inmunológica del cáncer: es un mecanismo supresor tumoral extrínseco que se activa solo después de que ha tenido lugar la transformación celular y han fallado los mecanismos supresores tumorales intrínsecos. En su forma más compleja, la immunoedición del cáncer consta de tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape.

3.5. Inmunoterapia del cáncer de pulmón

Hasta ahora nos hemos centrado en conocer los mecanismos que, de una u otra forma, intervienen en el desarrollo del cáncer, especificando incluso aquellos sobre los que se apoya el cáncer de pulmón. Detenernos a analizar cada una de las etapas necesarias antes de que se produzca una enfermedad clínicamente aparente nos permite comprender que se trata de un proceso complejo, multifacético, y que involucra diversos sistemas sobre los que podremos actuar de forma terapéutica.

Por definición, la inmunoterapia es aquella arma terapéutica capaz de interactuar con el SI para tratar el cáncer. Se clasifica como terapia pasiva y activa (Ilustración 6) (6).

3.5.1. Vacunas frente al cáncer o terapia pasiva

Aquella en la que se administra al paciente un agente inmunológico activo previamente fabricado, por lo que es independiente del sistema inmune del huésped para provocar en éste algún efecto.

Entre las terapias pasivas incluimos los anticuerpos monoclonales como el Trastuzumab o el Rituximab, y las terapias celulares adaptadas, tales como la infusión de Linfocitos Infiltrantes de Tejido Tumoral (LIT), receptores de células T (TCR) y receptor de antígeno quimérico fabricados mediante ingeniería genética.

3.5.2. Inhibidores de los puntos de control o terapia activa

Consiste en estimular el sistema inmune del paciente para que reconozca a las células tumorales como extrañas. Ejemplos de este tipo de inmunoterapia son las vacunas con antígenos tumorales unidos a moléculas adyuvantes que mejoran la acción de las citocinas, y los inhibidores de los puntos de control inmunitario o "*immune checkpoints*", independientes de antígeno y que se encargan de modular la función de las células T.

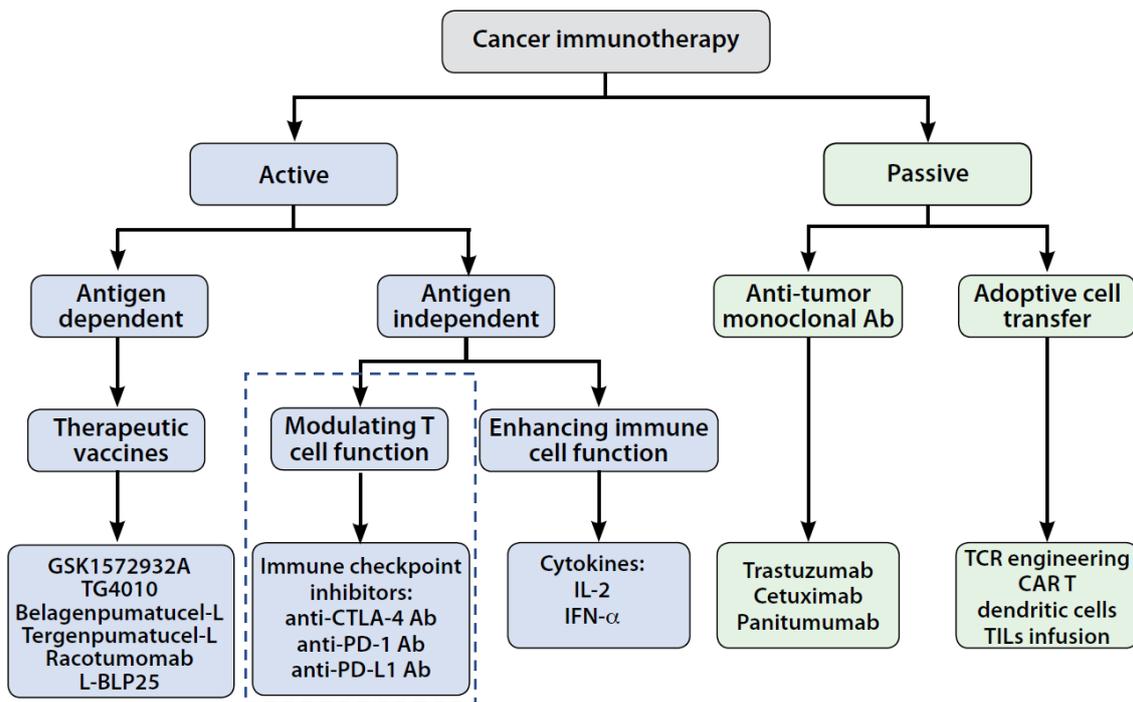


Ilustración 6. Tipos de inmunoterapia en cáncer de pulmón. Ab = anticuerpo; CTLA = proteína asociada a linfocitos T citotóxicos; PD-1 = proteína de muerte celular programada-1; PD-L1 = ligando de proteína celular programada-1; IL-2 = interleucina-2; IFN- α = interferón alfa; CAR-T = receptor de antígeno quimérico de células T; TIL = linfocitos infiltrantes de tumor.

El mejor conocimiento acerca de la interacción sistema inmune-tumor ha permitido la identificación de CTLA-4 y PD-1/PD-L1 como factores clave a través de los cuales los tumores son capaces de escapar a la respuesta inmunológica del huésped. También ha dado paso al desarrollo de una nueva generación de agentes inmunoterápicos que se unen a estas moléculas. Los inhibidores de los puntos de control inmunitario representan un gran paso en el tratamiento del cáncer. Múltiples estudios demuestran que tienen una actividad elevada y duradera en una gran variedad de tumores sólidos, incluido el CPNM. Los fármacos los podemos dividir en inhibidores de CTLA-4, inhibidores de PD-1 e inhibidores de PD-L1. En nuestro caso haremos mención a los anti-PD-L1 y anti-PD-1.

Inhibidores de PD-L1

Mientras que los anticuerpos anti-PD-1 actúan bloqueando la interacción con ambos ligandos (PD-L1 y PD-L2), los anticuerpos dirigidos frente a PD-L1 sólo interrumpen la unión PD-1/PD-L1. Entre los fármacos inhibidores de PD-L1 encontramos el atezolizumab, durvalumab, y avelumab. El atezolizumab y durvalumab son anticuerpos monoclonales humanizados de la inmunoglobulina

G1 (IgG1) con Fc reformado mediante ingeniería genética para eliminar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, según siglas en inglés). Sin embargo, avelumab es un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 totalmente humanizado, sin ninguna modificación.

Muchos inhibidores de PD-L1 han reportado predominante actividad en tumores sólidos como los CPNM. Estudios en fase III confirman que la actividad de estos agentes está en progresión.

Atezolizumab

En aquellos casos CPNM que expresan PD-L1 se ha visto que el atezolizumab puede mejorar la proporción de pacientes que consiguen una ratio de respuesta favorable en comparación con los controles históricos, según nuevos estudios (9). La eficacia de atezolizumab en estos estudios en términos de eficacia y perfiles de toxicidad sobre la quimioterapia convencional lo ha convertido en el tercer inhibidor de punto de control PD-1 / PD-L1 aprobado por la FDA para CPNM avanzado recurrente. La selección de los pacientes debe ser óptica con respecto al perfil de expresión de PD-L1 (10).

Sin embargo, a pesar de eficacia mostrada por el atezolizumab, por el tipo de estudio que se ha empleado, se recomienda continuar con las investigaciones antes de recomendar el uso de este fármaco en primera línea (11).

Durvalumab

Un estudio publicado en *The New England Journal of Medicine* comparó el empleo de durvalumab como terapia consolidada con platino en un grupo de pacientes con CPNM localmente avanzado (estadio III), irresecable, y cuyo crecimiento había persistido a pesar del empleo de quimioterapia. Los resultados que arrojó dicho estudio informaban de que el tiempo libre de enfermedad es significativamente mayor en aquellos pacientes tratados con el anti-PD-L1. La seguridad fue similar en ambos grupos (12).

Avelumab

Los hallazgos de los primeros estudios de avelumab en CPNM han sido prometedores, con una tasa de respuesta del 12% en los pacientes con progresión de la enfermedad después del empleo de quimioterapia basada en platino. Hubo una tendencia hacia una mayor actividad en pacientes con tumores PD-L1 positivo. Entre los pacientes tratados con avelumab como fármaco de primera línea, la tasa de respuesta objetiva y las tasas de control de la enfermedad fueron 18.7% y 64%, respectivamente (6).

Inhibidores de PD-1

Los inhibidores de PD-1 incluyen agentes como el nivolumab y el pembrolizumab. El primero se trata de un anticuerpo monoclonal tipo inmunoglobulina G4 (IgG4) totalmente humanizado que interrumpe las señales mediadas por PD-1, liberando así a las células T de su interacción inhibitoria con PD-L1 y PD-L2. El segundo es un bloqueante de la unión entre PD-1 con PD-L1 en las células T, resultando en la activación de citotoxicidad tumoral específica. También tiene una región de fragmento cristalizable para minimizar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, según sus siglas en inglés) y la dependiente de complemento. Esta acción es importante porque una ADCC intacta tiene potencial suficiente para causar un agotamiento de las células T activadas y los linfocitos infiltrantes de tumores, y dar como resultado una actividad disminuida, ya que PD-1 se expresa en células T efectoras y otras células inmunes (6).

Pembrolizumab

La eficacia y la seguridad del pembrolizumab empleado a dos dosis distintas en pacientes intratables o con CPNM en estadio avanzado tratados previamente fue descrito en un estudio en fase I (KEYNOTE-001). La tasa de respuesta objetiva fue del 19,4% y la duración media de la respuesta fue de 12,5 meses. La supervivencia libre de progresión de enfermedad fue de 3,7 meses y la supervivencia global fue de 12 meses. La tasa de respuesta objetiva fue del 18% entre los pacientes previamente tratados y del 24,8% entre los no tratados. Para los pacientes cuya puntuación (*score*) de la proporción del tumor era de al menos un 50%, la tasa de respuesta objetiva fue del 45,2% y la supervivencia

libre de progresión fue de 6,3 meses. La tasa de respuesta objetiva fue similar independientemente de la dosis y el subtipo histológico; la tasa de respuesta fue más alta entre los fumadores que entre los no fumadores. Los eventos adversos relacionados con el tratamiento ocurrieron en el 70,9% de los pacientes; 9.5% tuvo un evento adverso de grado 3 o superior.

El fármaco también fue evaluado en un estudio en fase II/III en pacientes diagnosticados de CPNM avanzado (KEYNOTE-001). Un total de 1,034 pacientes recibieron, de forma aleatorizada, terapia ya sea con 2 mg/kg o 10 mg/kg de pembrolizumab o docetaxel a 75 mg/m² cada 3 semanas. Todos los pacientes tenían al menos un 1% de células tumorales positivas para la proteína PD-L1 medida mediante inmunohistoquímica (IHQ). La supervivencia promedio (SP) fue mayor con ambas dosis de pembrolizumab en comparación con el docetaxel. Entre aquellos pacientes con al menos un 50% de sus células positivas para PD-L1 la SP fue de 14,9 y 17,3 meses con pembrolizumab a dosis de 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente. En los pacientes que recibieron el docetaxel la SP fue de 8,2 meses. En un 63% de los pacientes sometidos a 2 mg/kg de pembrolizumab fue posible identificar alguna reacción adversa (de las cuales un 13% fueron de grado 3 – 5), y en un 66% de los que recibieron 10 mg/kg del mismo fármaco (de las cuales un 16% fueron de grado 3 – 5). Sin embargo, la citotoxicidad asociada al tratamiento con docetaxel fue del 81% (un 35% fueron de grado 3 – 5).

En el mismo estudio también se evaluó la seguridad y eficacia del pembrolizumab como fármaco de primera línea en pacientes con CPNM en estadio avanzado. La supervivencia libre de progresión y general fue de 6,2 meses y 22,1 meses, respectivamente. El incremento en la expresión de PD-L1 se asoció con supervivencias más prolongadas. En pacientes con expresión de PD-L1 del 50% o más, la supervivencia libre de progresión fue de 12,5 meses y se desconoce la supervivencia general en este grupo de pacientes. Por otra parte, para tumores con expresión de PD-L1 de 1% a 49%, la supervivencia libre de progresión y general fue de 4,2 meses y 14,7 meses, respectivamente.

El estudio KEUNOTE-024 es un estudio en fase III donde se comparó el pembrolizumab con la quimioterapia con platino. Se emplearon pacientes con NSNCLC en estadio avanzado y con una expresión de PD-L1 del 50% o mayor, y se les aplicó una u otra terapia de forma aleatorizada. Los resultados obtenidos mostraron que la supervivencia libre de progresión de la enfermedad es significativamente mayor con el pembrolizumab. Además, la tasa de respuesta fue mayor con el pembrolizumab y se evidenciaron menos efectos adversos con éste. Fue el primer estudio en el que se demostró la mayor eficacia de la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-1 como tratamiento de primera línea frente a la quimioterapia convencional en el cáncer de pulmón no microcítico (6). Ninguno de los pacientes tenía el gen EGFR mutado o traslocaciones en ALK, y en todos ellos la expresión de PD-L1 era elevada (13).

Las terapias con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 ponen en evidencia la existencia de un nuevo paradigma terapéutico en los casos de CPNM, con beneficios demostrados en múltiples estudios en pacientes con enfermedad avanzada y previamente tratados. Dichos estudios demuestran que la terapia con Pembrolizumab tienen mayor eficacia que la quimioterapia basada en platino en un grupo seleccionando de pacientes y ha recibido la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, según sus siglas en inglés) como tratamiento de primera línea. La expresión de PD-L1 está asociada a mejor eficacia, pero es un biomarcador imperfecto. De hecho, algunos autores lo consideran un desafío para patólogos y oncólogos.

Nivolumab

Se trata de la primera inmunoglobulina humanizada (IgG4) que demostró bloquear la unión del receptor PD-1 con sus dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, reestableciendo así la respuesta inmune celular. Nivolumab fue aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma en 2014, y en 2015 frente al CPNM avanzado (14,15,16). Los ensayos muestran que éste prolonga el tiempo libre de enfermedad, incrementa el rango de respuesta, y se considera una alternativa segura y efectiva para muchos pacientes. Ha demostrado tener beneficios superiores a los alcanzados con la quimioterapia estándar (17).

3.6. Expresión de PD-L1

En los estudios disponibles sobre la eficacia del tratamiento con inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1 en pacientes con CPNM los beneficios sólo fueron encontrados en un subgrupo de pacientes. Como la vía PD-1/PD-L1 está envuelta en el escape inmunológico de las células tumorales, estudiar la expresión de estas moléculas por el tumor ha permitido identificar aquellos pacientes que podrían beneficiarse de esta terapia inmunológica. La inmunohistoquímica es la técnica elegida para ello.

3.6.1. La inmunohistoquímica (IHQ)

Se trata de una técnica que permite la visualización de proteínas en una sección histológica y tiene mucha relevancia debido a que proporciona muy buenos resultados siempre que el procesado de la muestra se realice de forma adecuada. Un objetivo similar se busca en las muestras citológicas (6), en cuyo caso la tendencia es llamarla inmunocitoquímica. Sea como sea, el objetivo de esta técnica es identificar, pero también amplificar y hacer visible un antígeno específico que generalmente es una proteína. Se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia que se quiere identificar (antígeno primario o epítipo). Estos anticuerpos pueden tener unida una enzima o ésta puede encontrarse unida a un anticuerpo secundario que reconoce y se une al primario para luego desencadenar una reacción química utilizada para visualizar el epítipo mediante microscopio (18) (6). La señal de la IHQ la podemos localizar en una o más áreas subcelulares, tales como la membrana celular, en el citoplasma, o en el núcleo. Es un método rápido y relativamente barato que es preferido por los patólogos porque permite evaluar la estructura tisular y de las células tumorales (6).

Potencialmente la IHQ puede detectar como positivas células que muy raramente serían identificadas mediante fluorescencia in situ por hibridación (FISH), incluso con menos aumento del microscopio por el alto contraste de las células IHQ-positivas sobre las negativas. Aunque en los estudios de validación de la IHQ frente a PD-L1 se ha empleado biopsia, se ha visto que se podría utilizar otros medios de montaje como podría ser la citología incluida en parafina (bloque celular) (3,6) (Ilustración 7).

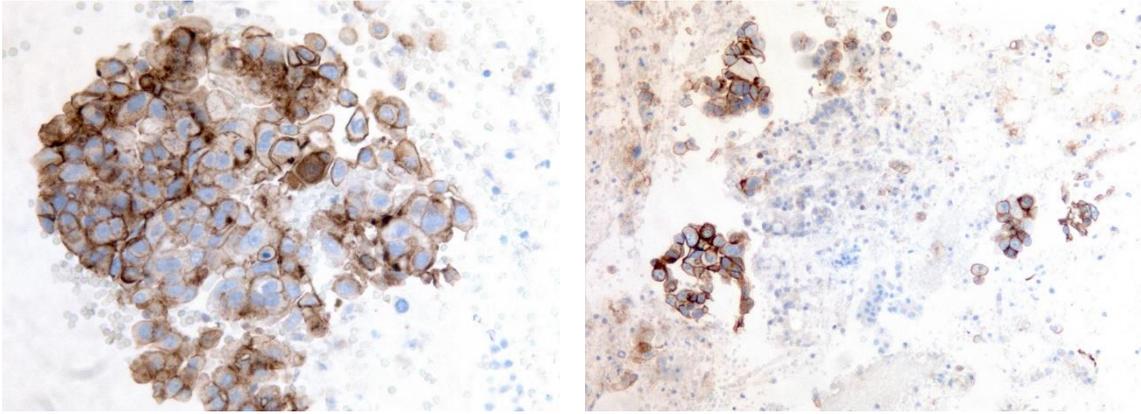


Ilustración 7. Muestra de Cáncer de Pulmón no Microcítico (CPNM) teñida sobre citología empleando el anticuerpo 22C3, anti ligando de proteína de muerte celular programada (PD-L1).

Se deben tener en cuenta diversos aspectos metodológicos que pueden influir en el resultado de la IHQ empleada frente a PD-L1.

Fase preanalítica

Se conoce como FFPE al procedimiento estándar que se debe seguir en la preparación de la muestra a la que más adelante se le realizará la IHQ. Las siglas corresponden a: Formol, Fijación, Parafina y Encajado (referido a estar dentro de un bloque de parafina en este caso). Se debe tener cuidado de no prolongar más de lo necesario el tiempo de isquemia de la muestra (tiempo entre que se extrae la muestra hasta que se fija).

El método de fijación recomendado es formol al 10% inmediatamente tras la extracción de la muestra, seguido de su procesado e inclusión en parafina (tejido FFPE). No se recomiendan tiempos de fijación menores a 6 horas, más bien de entre 6-48 horas (19,20).

En el caso de PD-L1, hasta la fecha, no se ha encontrado información acerca de los efectos que podría provocar un tiempo de isquemia prolongado. De todos modos, las recomendaciones actuales son que no sea mayor a 30 minutos y una posterior inmersión de la muestra en formol durante 6 – 48 horas. De acuerdo a los manuales disponibles en los kits de los anticuerpos 22C3 y 28-8 pharmDx, el único paso crucial en el procesado de la muestra es conseguir una fijación de al menos 3 horas, el resto del procedimiento se puede continuar según el protocolo estándar.

Fase analítica

Múltiples factores deben ser controlados durante el análisis: el desarrollo adecuado de anticuerpos, la forma de recuperación del epítipo, tipo y concentración del anticuerpo, tiempo de incubación, y señal de rastreo microscópico (reacción química desencadenante).

La preservación antigénica para la IHQ es epítipo dependiente, y algunos epítipos pueden no estar bien anclados con un tiempo de fijación de unas 120 horas. Una vez la afijación inicia, la proteína objeto de estudio puede cambiar su forma (configuración tridimensional) de manera inadvertida por la técnica.

En la práctica se emplea un buffer de formaldehído para aumentar los enlaces cruzados entre las proteínas, mejorando así la estabilidad tisular. Por lo tanto, podría ser distinta la proteína que se "friza" que la que se fija. El procesado va dirigido a posibilitar el reconocimiento del epítipo por el Ac primario. Sin embargo, existe una gran variedad de técnicas destinadas a esta función, por lo que se debe tener cuidado y usar sólo métodos recomendados y probados para el ensayo PD-L1-IHQ (6).

En el caso de PD-L1 se debe tener la misma precaución y se deben controlar los problemas ya mencionados, además de que los test comerciales empleados deben haber sido estandarizados y clínicamente validados (Ilustración 8). Las condiciones preanalíticas pueden afectar el resultado final, como vimos anteriormente. Es por esto por lo que es crucial que el método empleado por los laboratorios en la fabricación de los test tenga validez clínica y analítica.

Drug	PD-L1 Diagnostic Antibody Clone	PD-L1 Binding Domain	Platform	Second-line Criteria for PD-L1 Positivity
Nivolumab (Bristol-Myers Squibb)	28-8 (rabbit)	Extracellular	Link 48 Autostainer	≥1% tumor cells
Pembrolizumab (Merck)	22C3 (mouse)	Extracellular	Link 48 Autostainer	≥50% tumor cells
Atezolizumab (Genentech/Roche)	SP142 (rabbit)	Cytoplasmic	BenchMark ULTRA	Tumor cells and/or tumor-infiltrating immune cells
Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune)	SP263 (rabbit)	Extracellular ^a	BenchMark	≥25% tumor cells
Avelumab (Pfizer/Merck Serono)	73-10	unknown	Dako assay	≥1% tumor cells

Ilustración 8. Clones de anticuerpos con sus respectivas plataformas de producción y los criterios de positividad.

Fase pos-analítica

La fase post-analítica inicia con la evaluación microscópica de las muestras teñidas. La intensidad de la tinción depende del tipo del sistema empleado. Se trata de una evaluación subjetiva hasta cierto punto, aunque bien es cierto que se ha intentado disminuir dicha variación de interpretación cambiando el enfoque del procedimiento. El empleo de microscopios con una resolución espacial inherente es una ayuda física en la evaluación de la intensidad de la muestra, como se empleó por primera vez en el análisis de HER2 (21). Esta medida permite mayor homogeneidad a la hora de clasificar las muestras por distintos patólogos. De este modo, se denomina “tinción fuerte” (3+) a aquella capaz de visualizarse a aumentos de x2 o x4 del microscopio, “tinción moderada” (2+) cuando se requieren aumentos x10 o x20 para ser claramente visibles, y las “tinciones débiles” (1+) sólo son vistas a un aumento x40. El “histo-score” clásico (H-score) se obtiene multiplicando el porcentaje de células tumorales que se tiñen positivamente por diferentes intensidades (0, 1, 2 o 3), produciendo un rango de 0 a 300 para una puntuación total. Este enfoque tiene más en cuenta la heterogeneidad de la tinción.

Recientemente, se introdujo el término "control del rendimiento crítico del ensayo de inmunohistoquímica" para referirse al empleo de controles positivos externos (iCAPCs, en inglés). Los iCAPCs supervisan el rendimiento general del

sistema, pero, como cualquier otro control positivo externo, no informan completamente sobre los resultados con muestras de pacientes individuales porque los resultados finales también dependen sustancialmente de las variables preanalíticas que son exclusivas de las muestras de los pacientes. El control positivo óptimo de IHQ tiene un rendimiento de intensidad igual o superior al límite inferior de detección y se define por una reacción positiva observada (tinción) en un elemento tisular/celular que se sabe que expresa bajos niveles del marcador evaluado (22).

El uso de un control positivo interno a veces hace innecesario aplicar un control externo; sin embargo, se aconseja mantenerlo porque no todas las muestras contendrán el antígeno en cuestión, y los controles positivos internos normalmente tienen una concentración de epítipo relativamente alta. Esto es importante porque los controles positivos internos rara vez brindan información si se logra la sensibilidad recomendada en el protocolo de IHQ, algo que sí hace los controles positivos externos al tener baja concentración de epítipo (Ilustración 9). El tejido se coloca en el mismo portaobjetos que el tejido a analizar.

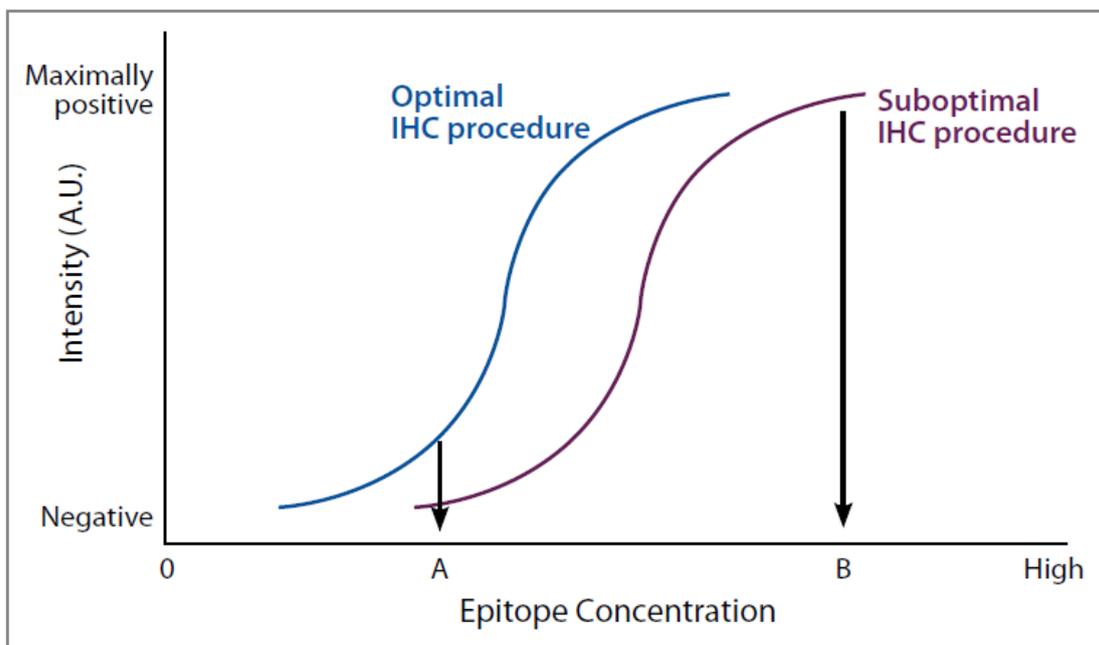


Ilustración 9. Relación entre la concentración epítipos y la intensidad de la inmunohistoquímica en caso de un procesamiento óptimo o subóptimo. En el procesado óptimo, la intensidad de la tinción y la concentración de epítipo (A) será débilmente positiva, pero será negativa en caso de un procesado subóptimo. Sin embargo, cuando un control tiene una alta concentración de epítipos, como en el caso de los controles internos, la diferencia entre los dos procesados es imperceptible. AU = arbitrary unit.

La estandarización de los controles, tanto positivos como negativos, es necesaria para el diagnóstico y la actividad predictiva de la inmunohistoquímica. Sin embargo, esto no se ha conseguido de forma global. Por tanto, la relevancia y la aplicabilidad de los controles continúa siendo un reto, ya que no está claro cuáles son aplicables y/o útiles en la práctica clínica diaria (23,22).

3.6.2. Anticuerpos comercializados frente a PD-L1

Existen diversos anticuerpos en el mercado (28-8, 22C3, SP142, SP263, y 73-10), uno según el tipo de terapia a utilizar. De este modo, en los estudios de pembrolizumab se ha empleado el anticuerpo 22C3 de Dako (PD-L1 pharmDx) para determinar la expresión tumoral de PD-L1 (24,25,3) (25). Se trata de un test aprobado por la FDA. En el caso del nivolumab el clon de anticuerpo validado es el 28-8, también de Dako (3). El anticuerpo SP142 y el SP263 han sido usados en los estudios con atezolizumab (26) y durvalumab (27), respectivamente, mientras que en los estudios de avelumab ha sido empleado el 73-10 (6).

Por tanto, el uso de PD-L1 como biomarcador es un ejercicio complejo tanto para los patólogos como para los oncólogos, ya que los ensayos disponibles incluyen diferentes clones de anticuerpos (Ilustración 11), y el protocolo de tinción y el punto de corte de positividad de cada ensayo es distinto en algunos casos (28,29).

3.6.3. Interpretación

Interpretación de PD-L1 en histología

En el análisis histológico es necesario excluir de la evaluación todas aquellas zonas en las que encontremos células necróticas o células malignas degeneradas. Se requiere un número mínimo de células tumorales para considerar la muestra valorable, que dependerá del anticuerpo empleado. De este modo, en el caso de los ensayos con SP142 se pide un mínimo de 50 células, mientras que en el caso de los anticuerpos 28-8 y 22C3 son necesarias al menos 100 células. Las células inmunes, tales como los linfocitos infiltrantes y los macrófagos, servirán como control interno positivo. Se debe considerar inaceptable cualquier tinción de fondo con una intensidad 1+ (Ilustración 11).

Drug	Antibody Clone
Nivolumab	28-8 (Dako)
Pembrolizumab	22C3 (Dako)
Atezolizumab	SP142 (Ventana)
Durvalumab	SP263 (Ventana)
Avelumab	73-10 (Dako)



Ilustración 11. Clones de anticuerpos en diagnóstico inmunohistoquímico de PD-L1.

Ilustración 11. Muestra de tumor no microcístico teñida con el anticuerpo 22C3 frente a PD-L1, en la que el fondo muestra una intensidad mayor de 1+.

Interpretación de PD-L1 en citología

En este caso la cuantificación de PD-L1 resulta un verdadero reto. La falta de arquitectura tisular dificulta la distinción de las células inmunitarias relevantes de las células tumorales, y la interfaz epitelio-estromal de las células inmunes que están fuera de los límites del tumor y que, por tanto, se consideran irrelevantes en la evaluación de PD-L1.

Por otra parte, los linfocitos preexistentes en un aspirado con aguja fina de un ganglio linfático son un factor de confusión importante. Sin embargo, los datos emergentes de bloques celulares y muestras histológicas coincidentes sugieren que el material citológico es tan bueno como el material histológico para el análisis de células tumorales PD-L1 IHQ (3,30) (Ilustración 12).

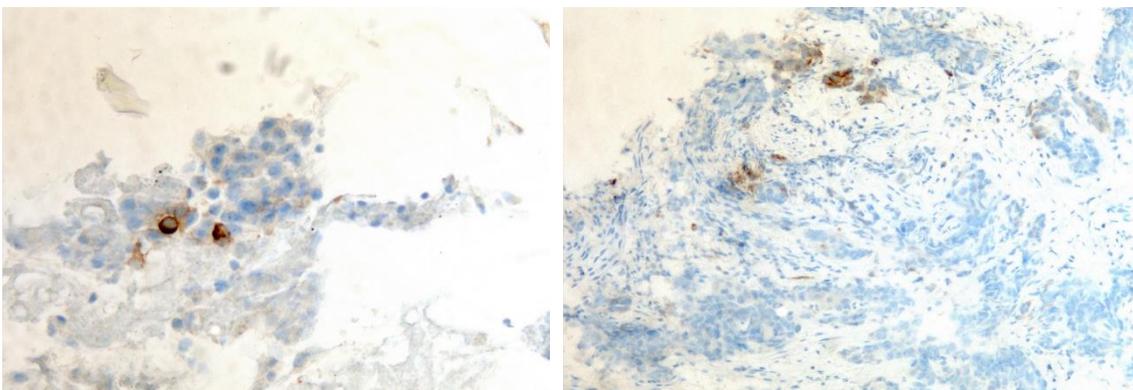


Ilustración 12. Muestras de Cáncer de Pulmón no Microcístico (CPNM) de un mismo caso teñidas sobre material citológico obtenido mediante Ecobroncoscopia lineal (EBUS) (imagen de la izquierda) e histología (imagen de la derecha) utilizando el anticuerpo 22C3, anti ligando de proteína de muerte celular programada (PD-L1). Ambas determinaciones coincidieron en un valor de expresión de PD-L1 del 10%.

Definición de positividad de PD-L1 en el CPNM

No todas las definiciones son iguales, sino que depende del anticuerpo empleado. De este modo, en el caso de los clones 28-8, 22C3, SP263 y 73-10 se considera positivo cuando se produce tinción circunferencial o lineal parcial de la membrana plasmática de las células tumorales, independientemente de la intensidad. La tinción citoplasmática en las células tumorales no parece tener significado en la evaluación, excepto cuando se emplea el anticuerpo SP263. Las células no malignas, las inmunológicas, y las zonas de necrosis también podrían teñirse con PD-L1; sin embargo, estas células no deberían tenerse en cuenta en el análisis de la positividad de PD-L1 en los tumores.

La expresión de PD-L1 es continuamente variable, por lo que se debe valorar la subjetividad interobservador dada la implicación clínica que esto representa. Con respecto a esto se realizó un estudio en el que se seleccionó a un grupo de 15 pacientes con CPNM y nueve observadores (Ilustración 13) (31,32). En general, la variabilidad interobservador es de menos de una 10%.

Study	Threshold	Antibody			
		28-8	22C3	SP142	SP263
Scheel 2016 ¹	1%/50%	2.8%/5.2%	7.4%/8.3%	9.6%/8.5%	6.3%/7.4%
Cooper 2016 ²	1%/50%		15.8%/18.1%		

Ilustración 13. Variación interobservador en un grupo de pacientes.

Heterogeneidad en la evaluación de PD-L1

Dado que normalmente PD-L1 se expresa de forma parcheada, es recomendable dividir el campo visual en cuadrantes y evaluar cada área por separado. El promedio de la positividad de todos los campos se considerará como el porcentaje de positividad de la muestra total.

En dos estudios se comparó la heterogeneidad según el origen de las muestras (biopsia o resección quirúrgica). Según el primero (Kitazono 2015) (33), existe una concordancia del 92%, mientras que en el otro (Ilie 2016) (34) sólo del 52%. En dichos estudios no quedaban claras las variaciones preanalíticas, por lo que es un aspecto que necesita ser más estudiado.

Por lo tanto, es inevitable cometer imprecisiones en las pruebas de expresión y análisis de PD-L1. El hecho de que aproximadamente el 10% de los cánceres no microcíticos respondan a los inhibidores de PD-1/PD-L1 a pesar de la ausencia de expresión de PD-L1, puede explicarse en parte por resultados falsos negativos en muestras de tumores muy heterogéneos.

3.6.4. Recomendaciones generales

- Aunque las prácticas varían, se recomienda enfáticamente que los patólogos interpreten los resultados de todos los controles positivos como parte integral de la interpretación y se informe de los resultados de la tinción de IHQ.
- Los marcadores predictivos como PD-L1 nunca deberían evaluarse en ausencia de controles de referencia (23).
- Suponiendo que estas recomendaciones son parte del procedimiento operativo estándar y que los controles se interpretan adecuadamente, estos detalles no necesitan escribirse en el informe del paciente.
- Se debe informar el nombre del kit de diagnóstico y los criterios de diagnóstico utilizados.
- En los casos en que la tinción de PD-L1 está ausente en el tumor, se debe mencionar la adecuación de la tinción empleada en la muestra control de PD-L1.
- Debido a que la respuesta terapéutica de los inhibidores del punto de control inmunológico es proporcional al grado de reactividad de PD-L1, se recomienda informar la extensión de las células tumorales positivas al menos en incrementos de 10%. Si en el momento de la prueba se conoce el agente inmunoterapéutico que se utilizará los resultados pueden informarse en términos de categorías amplias, como pueden ser: <1%, 1% a 49%, > 50%.

4. PRESENTACIÓN DE VARIABLES

Se considera variable a aquella característica que puede fluctuar y cuya variación es susceptible de adoptar diferentes valores, los cuales pueden medirse u observarse. Las variables adquieren valor cuando se relacionan con otras variables, es decir, cuando forma parte de una hipótesis o de una teoría.

4.1. Definición de variables

- **Biopsia:** procedimiento mediante el cual se extrae una muestra de tejido para su posterior análisis microscópico requiriendo antes la aplicación de una tinción que permita destacar aquellos elementos de interés.

- **Citología:** es el estudio de las células.

- **PD-L1:** ligando 1 de la proteína de muerte celular programada, proteína involucrada en el control inmunológico y cuya expresión en los tejidos ha demostrado tener implicaciones terapéuticas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se muestrearon 86 pacientes diagnosticados de Cáncer de Pulmón No Microcítico. Los casos se identificaron a partir de la base de datos del servicio de Anatomía Patológica (AP) del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), ubicado en Santander, Cantabria, España. Se seleccionaron aquellos casos diagnosticados mediante biopsia a la que además se le aplicó la IHQ de PD-L1, y que conjuntamente se les había tomado muestra mediante EBUS, por lo que de cada paciente se disponía de una biopsia y un bloque celular.

El procesado las muestras se realizó según lo recomendado por la casa comercial del anticuerpo empleado.

5.1. Población

Todo paciente con diagnóstico histológico de CPNM susceptible de aplicar IHQ con anticuerpo anti-PD-L1, según la base de datos del servicio de Anatomía Patológica de Valdecilla (HUMV). 86 pacientes en total.

5.2. Consideraciones éticas

La información de los pacientes fue anonimizada con el objetivo de proteger la identidad de los mismos.

5.3. Muestra

16 pacientes con determinación inmunohistoquímica de PD-L1 tanto en muestra histológico como en citología (bloque celular).

5.4. Criterios de inclusión y de exclusión

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de CPNM mediante biopsia o citología.
- Susceptibilidad para realizar determinación de PD-L1.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de CPNM mediante biopsia, pero a los que no se les realizó citología.

- Pacientes con diagnóstico de CPNM mediante citología, pero a los que no se les realizó diagnóstico histológico.
- Pacientes con diagnóstico de CPNM mediante biopsia/citología, pero con citología/biopsia negativa.
- Pacientes con diagnóstico de CPNM mediante biopsia/citología, pero con citología/biopsia no valorable.
- Aquellos casos en los que la determinación de PD-L1 se realizó en un medio distinto al bloque celular.

5.5. Variables y su operacionalización

Variable	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala
Biopsia	Es la extracción de una pequeña porción de tejido para su posterior examen microscópico.	Maligna SSM ¹	Base de datos de AP ²	Nominal
Citología	Estudio microscópico de las células.	Maligna SSM ¹	Base de datos de AP ²	Nominal
PD-L1	Proteína que ayuda a controlar las respuestas inmunitarias del cuerpo.	Positivo Negativo	Base de datos de AP ²	Nominal
PD-L1	Proteína que ayuda a controlar las respuestas inmunitarias del cuerpo.	Negativo Positivo bajo Positivo alto	Base de datos de AP ²	Ordinal

Tabla 1. Operacionalización de las variables. (1) Sin evidencias de malignidad, (2) Anatomía Patológica.

5.6. Técnica de detección de expresión de PD-L1 validada.

Se ha utilizado material tisular fijado en formol e incluido en parafina de los bloques celulares obtenidos a partir de citología realizadas a los pacientes incluidos en el estudio. De todos ellos se practicaron cortes de 3µm de grosor que fueron depositados en portaobjetos xialinizados. Se procedió a la realización de inmunotinción con el anticuerpo monoclonal frente a PD-L1 (Clon 28-8 Dako Glostrup Dinamarca) en plataforma automatizada Autostainer (Dako) y contratinción con Hematoxilina de Harris. En todos los casos se incluyó un control negativo de tinción consistente en un corte del mismo tejido con el mismo proceso sin incluir el anticuerpo primario. Como control positivo se utilizan dos líneas celulares humanas embebidas en parafina y fijadas con formalina con expresión conocida de PD-L1. La visualización se ha realizado en microscopio

de campo claro Olympus BX41. Debido al agotamiento del Clon 28-8 de Dako, en las muestras citológicas se empleó el anticuerpo SP263. Ambos anticuerpos utilizan el mismo patrón de expresividad.

- **Controles:** se emplearon los portaobjetos suministrados por la casa comercial los cuales contenían cortes de dos líneas celulares en forma de sedimento fijadas en formol e incluidas en parafina (Ilustración 14).

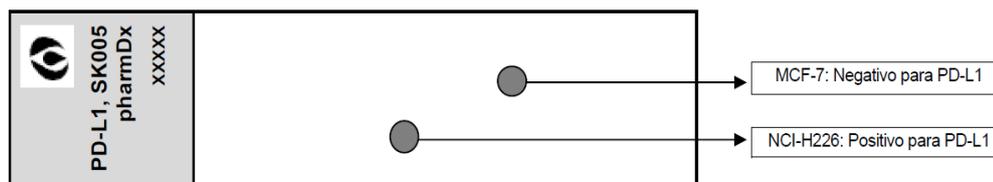


Ilustración 14. NCI-H226 con expresión positiva de la proteína PD-L1 y MCF-7 con expresión negativa de la proteína PD-L1.

- **Almacenamiento:** todos los componentes, incluidos los controles, fueron protegidos de la luz a 2-8 °C en el recipiente original cuando no estaban siendo utilizados en Autostainer, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.
- **Protocolo de tinción**
 - o **Paso 1:** procedimiento de desparafinización, rehidratación y recuperación antigénica.
 - o **Paso 2:** Procedimiento de tinción
 - o **Paso 3:** Contratinción
 - o **Paso 4:** Montaje
- **Interpretación de la tinción**
 - o La evaluación de la expresión de PD-L1 se realizó en base a un recuento manual del porcentaje de células neoplásicas con tinción de membrana, fuese parcial o completa, independiente de su intensidad.
 - o El porcentaje de células tumorales viables que exhibían positividad de membrana fueron reportadas como negativos, entre 1% y 49%, y mayor o igual a 50%, tanto en el Clon 28-8 como en el SP263.
 - o Se realizó una evaluación completa de las muestras. Todas las

células tumorales viables del portaobjetos del paciente con tinción de PD-L1 fueron evaluadas e incluidas en la puntuación final del análisis.

- Aquellos casos en los que el número de células tumorales era menor a 100 fueron etiquetadas como no valorables.
- A la hora de realizar la puntuación fueron desechadas las tinciones citoplasmáticas y de células benignas (por ejemplo, linfocitos infiltrantes o macrófagos). En el caso del SP263 sí fueron tomadas en cuenta las tinciones citoplasmáticas siempre y cuando existiera una tinción de membrana apreciable claramente.

5.7. Procesamiento de los datos

Una vez seleccionada la población a estudiar se procedió a la tabulación de la información de los casos en una base de datos de Excel 2016. Hecho esto se comprobó y corrigió cualquier error producido durante la recopilación de datos.

Posteriormente fueron realizados dos cribados. En el primero de ellos se acotó la población aplicando los criterios de exclusión quedando sólo aquel grupo de casos en los que se disponía tanto de biopsia como de citología (Tabla 2). En un segundo tiempo se comprobó en cuáles de éstos la citología estaba incluida en bloque celular, y este grupo fue considerado la muestra para el estudio (Tabla 3).

SELECCIÓN DE LA MUESTRA			
	Biopsia + citología	Recuento	45
		% del total	52,33%
	Biopsia o citología	Recuento	24
		% del total	27,90%
	No valorable¹	Recuento	7
		% del total	8,14%
SEM²	Recuento	10	
	% del total	11,63%	
TOTAL		Recuento	86
		% del total	100,0%

Tabla 2. Selección de muestra. (1) Muestra insuficiente, (2) Sin evidencias de malignidad.

Esta tabla se trata de una representación de los criterios de inclusión y exclusión aplicados sobre la población inicial. De los 86 casos seleccionados (100%), 24 (27,90%) poseían biopsia o citología, pero no ambas técnicas. 7 casos (8,14%) fueron considerados como “no valorables” por muestra insuficiente o por tratarse de muestras de un origen distinto al pulmonar (p.e. LCR); 10 (11,63%) carecían de sospechas de malignidad y, finalmente, 45 casos (52,33%) poseían tanto biopsia como citología.

De los 45 casos de los que disponíamos tanto de biopsia como citología (52,33% de la población), 4 de ellos fueron excluidos de la muestra por considerarse no valorables para la determinación de PD-L1, y 25 por estar incluidos en un medio distinto al bloque celular (p.e. frotis en portaobjetos). Los casos restantes (16) cumplían los criterios de inclusión y no cumplían ningún criterio excluyente, por lo que fueron considerados la muestra a analizar (N) (Tabla 3).

MEDIO DE INCLUSIÓN DE LA MUESTRA			
	Citología en bloque celular (muestra= N)	Recuento	16
		% del total	35,56%
	PD-L1 no valorable¹	Recuento	4
		% del total	8,89%
	Otros	Recuento	25
		% del total	55,56%
TOTAL		Recuento	45
		% del total	100,0%

Tabla 3. Medio de inclusión. (1) Muestras incluidas en bloque celular, pero PD-L1 no valorable por insuficiencia de material celular para el análisis.

5.8. Plan de análisis

Para poder dar respuesta a los objetivos de la investigación se realizó un volcado de la muestra al paquete estadístico SPSS versión 24, donde se obtuvieron los datos que sirvieron para crear las tablas necesarias para aproximarnos al propósito del estudio.

Al tratarse de una muestra pequeña, datos emparejados y variables cualitativas, en primer lugar, se calcularon las frecuencias. Posteriormente se realizó un cruce empleando el test estadístico no paramétrico de McNemar.

Cruce de variables:

- Determinación de PD-L1 en citología vs determinación de PD-L1 en biopsia. McNemar.
- Resultado “negativo” de PD-L1 vs origen de la muestra. McNemar.
- Resultado “positivo bajo” de PD-L1 vs origen de la muestra. McNemar.
- Resultado “positivo alto” de PD-L1 vs origen de la muestra. McNemar.

5.9. Limitaciones de la investigación

Las limitaciones que se presentaron en el transcurso de la investigación fueron las siguientes:

- Muchas de las muestras citológicas disponibles fueron excluidas del estudio por poseer poca celularidad y, por tanto, considerárselas no valorables.
- Agotamiento de los reactivos de PD-L1 Clon 28-8.
- Pocos casos analizados (N pequeña).

6. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Partiendo de los 16 casos seleccionados de la población inicial, consultamos los resultados de PD-L1 realizados en biopsia. De cada uno de ellos se localizó una muestra citológica incluida en bloque de parafina sobre la se realizó IHQ anti-PD-L1. Los casos fueron catalogados como “negativo” si no expresaban PD-L1 o lo hacían por debajo del 1% de sus células; “positivo bajo” si la proporción de células tumorales que expresaban PD-L1 era de entre 1 y 50%, mientras que a aquellos con más de un 50% de expresión se les catalogó como “positivo alto”. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA DE FRECUENCIA			
IHQ anti-PD-L1 en biopsia y citología		MUESTRA	
		Biopsia	Citología
PD-L1	Negativo	4	10
	Positivo bajo	7	5
	Positivo alto	5	1
TOTAL		16	16

Tabla 4. Tabla de frecuencia.

Como podemos ver, en biopsia la proporción de negativos fue de un 12% (4 casos), de positivos bajos un 21,9% (7 casos) y de positivos altos un 15,6% (5 casos). Sin embargo, un 31,3% de las muestras fueron negativas en citología (10 casos), un 15,6% (5 casos) resultaron siendo de positividad baja y un 3,1% (1 caso) mostró positividad alta frente anti-PD-L1.

TABLA CRUZADA PD-L1*MUESTRA					
			MUESTRAS		TOTAL
			Biopsia	Citología	
PD-L1	Negativo	Recuento	4	10	14
		% del total	12,5%	31,3%	43,8%
	Positivo bajo	Recuento	7	5	12
		% del total	21,9%	15,6%	37,5%
	Positivo alto	Recuento	5	1	6
		% del total	15,6%	3,1%	18,8%
TOTAL		Recuento	16	16	32
		% del total	50,0%	50,0%	100,0%

Tabla 5. Tabla cruzada de IHQ-anti-PD-L1 y las muestras analizadas.

Al tratarse de una muestra pequeña de datos emparejados, sobre los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico descriptivo utilizando la prueba de McNemar (prueba no paramétrica) con el objeto de relacionar las variaciones de expresión de PD-L1 en biopsia y las producidas en citología (Tabla 6). Dado que es un test que requiere de la intervención de dos variables dicotómicas, se decidió dividir los casos en “negativos”, aquellos que no mostraron expresión o la mostraban menos del 1% de sus células, y “positivos”, aquellos con una expresión mayor a 1%. Las hipótesis propuestas fueron las siguientes:

- **H₀**: no hay diferencias en la proporción de casos positivos y negativos al realizar la determinación PD-L1 en biopsia o citología.
- **H₁**: hay diferencias significativas en la proporción de casos positivos y negativos al realizar la determinación PD-L1 en biopsia o citología.

TABLA CRUZADA PD-L1C*PDL1B					
			PD-L1B		TOTAL
			Positivo	Negativo	
PD-L1C	Positivo	Recuento	5	1	6
		% del total	31,3%	6,3%	37,5%
	Negativo	Recuento	7	3	10
		% del total	43,8%	18,8%	62,5%
TOTAL		Recuento	12	4	16
		% del total	75,0%	25,0%	100,0%
Prueba de McNemar					
		Valor	Significación exacta (bilateral)		
Prueba de McNemar			,070 ¹		
N de casos válidos		16			

Tabla 6. Tabla cruzada entre IHQ-anti-PD-L1 en citología (filas) y biopsia (columnas). (1) Distribución binomial utilizada.

Con **p= 0,070**, como la significancia es mayor que 0,05, estadísticamente no podemos rechazar que no hay diferencias entre la proporción de resultados negativos y positivos obtenidos en biopsia y citología (no rechazamos la H₀).

Para ampliar el análisis hemos considerado oportuno estudiar por separado cada una de las categorías en las que clasificamos los resultados de la expresión de PD-L1. De este modo, cruzando los resultados negativos en una tabla de contingencia con el origen de la muestra y aplicando el Test de McNemar hemos obtenido una $p= 0,832$, por lo que estadísticamente no podemos rechazar la hipótesis de que no hay diferencia significativa entre la proporción de resultados negativos obtenidos mediante biopsia y aquellos obtenidos mediante citología (Tabla 7). Lo mismo ocurre con los “positivos bajos”, en cuyo caso el valor de p ha sido de $0,424$ (Tabla 8). Sin embargo, en los casos de positividad alta la significancia ha sido menor a 0,05 ($p= 0,006$), por lo que en esta categoría sí existe diferencia estadísticamente significativa entre la proporción de resultados “positivos altos” obtenidos empleando biopsia y citología, es decir, rechazamos la hipótesis nula (Tabla 9).

TABLA CRUZADA PD-L1N*MUESTRA					
			MUESTRA		TOTAL
			Biopsia	Citología	
PD-L1 NEGATIVO	SI	Recuento	4	10	14
		% del total	12,5%	31,3%	43,8%
	NO	Recuento	12	6	18
		% del total	37,5%	18,8%	56,3%
TOTAL		Recuento	16	16	32
		% del total	50,0%	50,0%	100,0%
Prueba de McNemar					
		Valor	Significación exacta (bilateral)		
Prueba de McNemar			,832¹		
N de casos válidos		32			

Tabla 7. Tabla cruzada para la determinación de asociación entre resultados “negativos” (PD-L1 NEGATIVO) entre ambos tipos de muestras (biopsia y citología). (1) Distribución binomial utilizada.

TABLA CRUZADA PD-L1PB*MUESTRA					
			MUESTRA		TOTAL
			Biopsia	Citología	
PD-L1PB	SI	Recuento	7	5	12
		% del total	21,9%	15,6%	37,5%
	NO	Recuento	9	11	20
		% del total	28,1%	34,4%	62,5%
TOTAL		Recuento	16	16	32
		% del total	50,0%	50,0%	100,0%
Prueba de McNemar					
		Valor	Significación exacta (bilateral)		
Prueba de McNemar			,424¹		
N de casos válidos		32			

Tabla 8. Tabla cruzada para determinación de asociación entre resultados “positivos bajos” (PD-L1PB) entre ambos tipos de muestras (biopsia y citología). (1) Distribución binomial utilizada.

TABLA CRUZADA PD-L1PA*MUESTRA					
			MUESTRA		TOTAL
			Biopsia	Citología	
PD-L1PA	SI	Recuento	5	1	6
		% del total	15,6%	3,1%	18,8%
	NO	Recuento	11	15	26
		% del total	34,4%	46,9%	81,3%
TOTAL		Recuento	16	16	32
		% del total	50,0%	50,0%	100,0%
Prueba de McNemar					
		Valor	Significación exacta (bilateral)		
Prueba de McNemar			,006¹		
N de casos válidos		32			

Tabla 9. Tabla cruzada para determinar asociación entre resultados “positivos altos” (PD-L1PA) entre ambos tipos de muestras (biopsia y citología). (1) Distribución binomial utilizada.

7. CONCLUSIONES

- El Cáncer de Pulmón no Microcítico (CPNM) es un cáncer complejo, pero con unos mecanismos de escape inmunológico conocidos, lo que ha permitido avanzar en el desarrollo de nuevas terapias. Cada vez hay más estudios que apoyan el uso de inmunoterapia frente al cáncer, y una gran parte de ellos hacen mención a los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 en CPNM.
- Es necesario identificar a aquellos pacientes que podrían beneficiarse de la inmunoterapia y para ello se realiza la determinación de PD-L1. La inmunohistoquímica de PD-L1 es un buen marcador con valor predictivo de respuesta.
- Se requiere un procesado minucioso de las muestras dada la poca celularidad de estas.
- La heterogeneidad de PD-L1 explica que al menos un 10% de los CPNMs negativos para PD-L1 respondan a esta inmunoterapia.
- A pesar de los resultados de este estudio, la citología obtenida mediante EBUS y fijada en bloque celular es una forma prometedora como alternativa a la biopsia, incluso en aquellos casos en los que la positividad expresada en mayor al 50% de las células, al menos así lo avala el creciente número de publicaciones que apoyan esta teoría.
- Es necesario plantear la posibilidad de realizar un estudio con un mayor número de casos (N).
- Los servicios de Anatomía Patológica deben disponer al menos de un test validado que sea asequible económicamente, dado el gran volumen de muestras procesadas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SEOM. Las Cifras del Cáncer en España. Madrid; 2017.
2. ASLO. Cancer.Net. [Online].; 2018 [cited 2018 Febrero 15. Available from: <https://goo.gl/WEx2P3>.
3. Skov BG, Skov T. Paired Comparison of PD-L1 Expression on Cytologic and Histologic Specimens From Malignancies in the Lung Assessed With PD-L1 IHC 28-8pharmDx and PD-L1 IHC 22C3pharmDx. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017 Agosto; 25(7): p. 453-459.
4. Jonathan L, Robert AR. The Role of Checkpoint Inhibition in Non–Small Cell Lung. *Ochsner Journal*. 2017; 17: p. 379-387.
5. Lozano MD, Abengoza M, Echeveste JI, et al. Cytology smears in the era of molecular biomarkers in Non–Small Cell Lung Cancer. Doing more with less. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2018 Marzo; 142.
6. Ming S, Sanja D, Yasushi Y, et al. IASLC ATLAS OF PD-L1 IMMUNOHISTOCHEMISTRY TESTING IN LUNG CANCER Sound M, Dacic S, Yatabe Y, Hirsch FR, Kerr KM, editors. North Fort Myers: Rx Press; 2017.
7. Gettinger S. Immunotherapy of non-small cell lung cancer with immune checkpoint inhibition. [Online].; 2017 [cited 2018 Dic 30.
8. Alexander NS, Jedd W, Matthew H. Principles of cancer immunotherapy. [Online].; 2017 [cited 2017 12 30.
9. Peters S, Gettinger S, Johnson ML, et al. Phase II Trial of Atezolizumab As First-Line or Subsequent Therapy for Patients With Programmed Death-Ligand 1-Selected Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (BIRCH). *J Clin Oncol*. 2017; 35: p. 2781-2789.
10. Hanna N, Johnson D, Temin S, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2017 Octubre; 35(30).

11. Ilie M, Hofman P. Atezolizumab in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2017; 9(10): p. 3603-3606.
12. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *The new england journal of medicine*. 2017 Nov; 277: p. 1919–1929.
13. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2016; 375: p. 1823–1833.
14. Voena C, Chiarle R. Advances in cancer immunology and cancer immunotherapy. *Discovery Medicine*. 2016 Febrero; 21(114): p. 125-133.
15. Kazandjian D, Suzman DL, Blumenthal G, et al. FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist*. 2016 Mayo; 21(5): p. 634-642.
16. Dramatic Survival Benefit with Nivolumab in Melanoma. *Cancer Discover*. 2016 Junio; 6(6).
17. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *Journal of Cancer*. 2017; 8(3): p. 410-416.
18. Segovia SM, Enz N, Alsina Ál, Valdovinos BM. Uso y aplicaciones de la inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ghrelina para el estudio de la pulpa dentaria. *Rev. Fac. Med. UNNE (Univ.Nac.Nordeste)*. 2016; 36(3): p. 81-86.
19. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Archiv*. 2012; 461(3): p. 245-257.
20. Blackhall FH, Peters S, Bubendorf L, et al. Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK-positive resected stage I to III adenocarcinoma: results

from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *Journal of clinical oncology*. 2014 Sep; 32(25): p. 2780-2787.

21. Rüschoff J, Hanna W, Bilous M, et al. HER2 testing in gastric cancer: a practical approach. *Modern Pathology*. ; 25(5): p. 637-650.
22. Torlakovic EE, Nielsen S, Francis G, et al. Standardization of positive controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the International Ad Hoc Expert Committee. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2015 Enero; 23(1): p. 1-18.
23. Torlakovic EE, Francis G, Garratt J, et al. Standardization of Negative Controls in Diagnostic: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Panel. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Abril; 22(4): p. 241-252.
24. Garon E, Rizvi N, Hui R et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015 Abril; 372(21): p. 2018-2028.
25. Herbst RS, Baas P, Kim DW et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2015 Diciembre; 387(10027): p. 1540–1550.
26. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2018 387; 10030(1837-1846).
27. Rebelatto MC, Midha A, Mistry A et al. Development of a programmed cell death ligand-1 immunohistochemical assay validated for analysis of non-small cell lung cancer and head and neck squamous cell carcinoma. *Diagnostic Pathology*. 2016 Nov;; p. 95.
28. Sholl LM, Aisner DL, Craig T et al. Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry— A New Challenge for Pathologists: A Perspective

From Members of the Pulmonary Pathology Society. Archives of pathology & laboratory medicine. 2016 Abril; 140(4).

29. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? J Thorac Oncol. 2015 Julio; 10(7): p. 985-989.
30. Fernandez-Bussy S, et al. Expresión de PD-L1 en muestras de cáncer pulmonar no microcítico obtenidas por EBUS-TBNA. Arch Bronconeumol. 2017.
31. Scheel AH, Dietel M, Heukamp LC, et al. Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas. Modern Pathology. 2016 Julio; 29: p. 1165–1172.
32. Cooper WA, Russell PA, Cherian M, et al. Intra- and Interobserver Reproducibility Assessment of PD-L1 Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Research. 2017 Agosto; 15(23): p. 4569-4577.
33. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, et al. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non--Small-Cell Lung Cancer. Clinic Lung Cancer. 2015 Septiembre; 16(5): p. 385-390.
34. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: a potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. 2016 Enero; 27(1): p. 147-153.
35. Fitzgibbons PL, Bradley LA, Fatheree LA, et al. Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2014 Noviembre; 138(11): p. 1432-43.