



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 Cytologic and Biopsy
samples in Lung Cancer.

Autora: M^a Soledad Villa Quevedo.

Directores: Javier Gómez Román.
Javier Freire Salinas.

Santander, Junio 2022

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, agradecerles a mis tutores Javier Gómez Román y Javier Freire Salinas, el haberme permitido la realización de este trabajo, en el cual tenía un interés personal. En especial, a Javier Gómez Román. No solo por todo su apoyo y ayuda en general con todo el trabajo, sino con cada una de las dudas y/o complicaciones surgidas. Además de ello agradecerle que haya estado prestándome esa ayuda en este último empujón de estos seis años de esfuerzo.

En segundo lugar, mis apoyos incondicionales en lo que ha sido una carrera de fondo. Mis padres y mi hermana, quienes desde el minuto uno han tenido que sufrir todos los agobios y decepciones que ha podido haber, pero que desde ese momento han disfrutado todas las alegrías y la pasión con las que he vivido estos años. Entre mis apoyos incondicionales no me puedo olvidar de mis tíos y por supuesto de mis abuelos. Ellos que sin vivir conmigo han vivido en primera persona todo, porque día tras día durante todos estos años han mostrado su preocupación, apoyo e incluso admiración por el trabajo que he estado realizando. Destacar también el papel de mis amigos durante este tiempo, ellos que han creído en mi cuando yo no lo hacía. Por tanto, a los que habéis sido mis grandes apoyos gracias, gracias por vuestra manera diferente pero perfecta de haberme ayudado a llegar al final.

Mención especial quiero hacer a mi abuelo Pedro Villa, por el cual he realizado este trabajo y el cual sé, que hubiese estado orgulloso de que llegase este momento. Antes de entrar en medicina siempre hablábamos sobre la investigación y sobre lo que me gustaba. También hablábamos sobre lo poco que le quedaba para tener una nieta médico. Por desgracia y por poco, no ha podido llegar a verlo. Precisamente la causa ha sido un cáncer de pulmón avanzado sin ya opción de tratamiento. Esta ha sido mi manera de tenerle presente y de “devolverle” algo de lo que el me ha dado todos estos años.

ÍNDICE.

-	Índice	2.
-	Resumen	3.
-	Introducción	4.
-	PD-1/PD-L1	10.
	• Generalidades	10.
	• PD-L1 como biomarcador	12.
	• Fármacos	19.
	• Detección de la expresión de PD-L1	23.
	○ Citologías	23.
	○ Citologías frente a biopsias	26.
-	Estudio	29.
	• Hipótesis y objetivos	29.
	• Material y métodos	29.
	○ Biopsia-citología	29.
	○ Supervivencia libre de progresión	30.
	• Resultados y discusión	31.
	○ Biopsia-citología	31.
	○ Supervivencia libre de progresión	32.
	• Conclusión.....	35.
	○ Biopsia-citología	35.
	○ Supervivencia libre de progresión	36.
-	Conclusiones	37.
-	Referencias bibliográficas	38.

RESUMEN.

Actualmente, uno de los mayores retos de nuestra sociedad es la lucha contra el cáncer. Siendo uno de los más destacables por su mortalidad e incidencia, el de pulmón. Hay distintas maneras de tratarlo, pero el trabajo se centrará en una de ellas, la inmunoterapia, y dentro de esta, en el uso de anticuerpos monoclonales. En este trabajo vamos a hablar de una importante diana terapéutica, que a su vez, para el éxito de esta terapia, se usa como biomarcador. Esta es la vía PD-1/PD-L1, siendo la expresión del ligando el indicador de su efectividad. El punto que se va a estudiar es la detección de esta molécula. Esta ha sido aprobada por técnicas de biopsia, pero no todavía para las citológicas, cuando hay muchos estudios que como se verá, avalan su uso. Lo primero se presentará un marco teórico sobre esta vía y los puntos más importantes a conocer. En segundo lugar se expondrán los resultados de dos estudios realizados con pacientes del HUMV. Por un lado la correlación entre biopsias y citologías, y por otro la supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con estos anticuerpos cuya positividad para PD-L1 ha sido detectada por medio de citologías.

Palabras clave: Inmunoterapia, PD-L1, biomarcador, citología.

ABSTRACT.

Nowadays, one of the greatest challenges of our society is the fight against cancer. One of the most important is lung cancer because of its mortality and incidence. There are different ways to treat it, but this work will focus on one of them, immunotherapy, and within this, on the use of monoclonal antibodies. Here we are going to talk about an important therapeutic target, which in turn, for the success of this therapy, is used as a biomarker. This is the PD-1/PD-L1 pathway, being the expression of the ligand the indicator of its effectiveness. The point to be studied is the detection of this molecule. This has been approved for biopsy techniques, but not yet for cytological ones, when there are many studies that, as will be seen, support its use. First, a theoretical framework on this pathway and the most important points to know will be presented. Secondly, the results of two studies carried out with HUMV patients will be presented. On the one hand the correlation between biopsies and cytology, and on the other hand the progression-free survival in patients treated with these antibodies whose PD-L1 positivity has been detected by cytology.

Keywords: Immunotherapy, PD-L1, biomarker, cytology.

INTRODUCCIÓN.

La base de este trabajo radica en la **inmunoterapia**, concretamente aplicada al tratamiento del cáncer. De este modo, se basa en ayudar al sistema inmune en la identificación y destrucción de las células cancerígenas. Hay varios tipos, destacando en esta exposición, los anticuerpos monoclonales (1,2).

Es importante señalar, que el sistema inmune tiene diferentes **puntos de control** sobre los que vamos a poder dirigir esta terapia. Cuando uno de estos es activado, el sistema inmune ya no responde como debería, dando esto lugar a un sistema de evitación de la respuesta de este (3,4).

La importancia del estudio de distintos componentes del sistema inmune se ve apoyada también debido a que en individuos inmunocompetentes, puede haber supervivencia de células tumorales. Esto se debe a que estas células desarrollan mecanismos para evadir la vigilancia del sistema inmunológico, de manera que sobreviven a pesar de que el sistema inmune del individuo esté en perfectas condiciones para eliminar amenazas (5).

Para fijar unas bases sobre la inmunoterapia, tenemos que empezar diferenciándola en activa y pasiva. En la siguiente tabla se expone la información más básica que hay que tener clara para el trabajo (5).

ACTIVA (<i>in vivo</i>)		PASIVA (<i>in vitro</i>)	
Ag dependiente	Ag independiente	Acs monoclonales	Transferencia celular adaptativa
- Vacunas terapéuticas	- Modulación de la función de las células T. (Son los <i>immune checkpoints inhibitors</i>). - Mejora de la función celular inmune. Citoquinas como IL-2 y IFN- alfa.	- Dirigidos frente a PD-1. - Dirigidos frente a PD-L1.	- Ingeniería del receptor de las células T. - Antígenos quiméricos del receptor de células T. - Infusión de linfocitos infiltrantes de tumor.

(5,3).

La inmunoterapia como se ha indicado, la podemos dividir en dos vertientes. Por un lado la **activa**, y por otro la **pasiva** (5).

La primera consiste en la estimulación del sistema inmune del paciente, de manera que este reconozca como extraño el tumor. Hay distintos ejemplos subdivididos a su vez según si son antígeno dependiente o antígeno independiente. Dentro del primer subgrupo encontramos las vacunas terapéuticas, las cuales contienen antígenos tumorales. Dentro del segundo subgrupo, un par de ejemplos son los ***immune checkpoints inhibitors***, que modulan la función de las células T; y las citoquinas, que mejorarán la función celular inmune (5).

En cuanto a la inmunoterapia pasiva, se basa en el uso de agentes inmunológicos activos, producidos en el exterior del cuerpo humano. Es destacable que no van a depender del sistema inmune del paciente, a diferencia del grupo anterior. Al igual que en la inmunoterapia activa, se va a dividir en dos subgrupos. Por una parte tenemos la transferencia celular adaptativa, que incluye entre otros ejemplos, la infusión de linfocitos infiltrantes del tumor. Por otra parte, tenemos los anticuerpos monoclonales (5).

De los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, se van a beneficiar del tratamiento con inmunoterapia alrededor del 15 al 25% (6).

Como hemos dicho al principio, lo que se va a desarrollar en este trabajo está enfocado dentro de la terapia pasiva, los **anticuerpos monoclonales**. Veremos que lo que se va a estudiar es el uso del ligando PD-L1 como biomarcador, estudiándose su expresión para ver qué pacientes se beneficiarían con la terapia, mediante técnicas de inmunohistoquímica. Además se explicará la importancia de la **vía PD-1/PD-L1** y por ello, la importancia de estos anticuerpos monoclonales. No olvidarse de que este ligando es un biomarcador imperfecto, ya que está sometido a variabilidad (5,6,7).

Tener unos buenos biomarcadores para ver la utilidad o no del uso de estas terapias, va a tener como beneficio evitar los efectos adversos relacionados con la respuesta inmune, además de reducir costes (8).

Tasuku Honjo y sus compañeros de la Universidad de Kioto descubrieron la molécula de PD-1 en 1992. También en la década de los 90 fue descubierto el gen de PD-L1, concretamente en 1999. Este hallazgo fue mereció la concesión de un Premio Nóbel (9,10).

Los anticuerpos monoclonales, han sido diseñados para dirigirse a las células cancerosas. Dentro de ellos también podemos diferenciarlos en subtipos según su mecanismo de acción. Algunos se unen a las células cancerosas, otros bloquean las señales en la superficie de la célula cancerosa que le indique dividirse, mientras que otros portan radiación o una droga quimioterapéutica hacia las células cancerosas (2).

En este trabajo, como he indicado, me voy a centrar en el ligando 1 de muerte programada (PD-L1), siendo este parte de una de las vías más importantes para controlar el crecimiento del cáncer en el sistema inmune. Destacando así la vía PD-1/PD-L1 y CTLA-4. A estas vías las denominamos **immune checkpoints** (puntos de control inmunitarios). Ambas dos regulan negativamente a la célula T (11,12).

PD-L1 que como hemos dicho es expresado por las células cancerígenas, se liga a PD-1 que es expresado y regulado por los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), evadiendo la vigilancia por parte del sistema inmune (5).

La clave está en que PD-1, que es la proteína transmembrana a la que se une el ligando PD-L1, tiene la base de su actuación en el **bloqueo de las células T activadas**. De esta manera, inhibe el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Lo que ocurre cuando se unen estas moléculas, es que hace que los linfocitos T pierdan la capacidad tanto proliferativa como secretora de citoquinas y la actividad lítica tumoral. De esta manera, ha perdido su funcionalidad (3).

Esto lo vemos representado en la figura 1. En ella vemos en la parte superior una célula T funcional, que por medio de los mecanismos de actuación representados elimina la célula cancerígena. Mientras que en la representación inferior vemos, como se ha explicado en el párrafo anterior; que la expresión de PD-1 por parte del linfocito T y la expresión de PD-L1 por la célula tumoral, al unirse, va a inhibir la funcionalidad de la célula T (5).

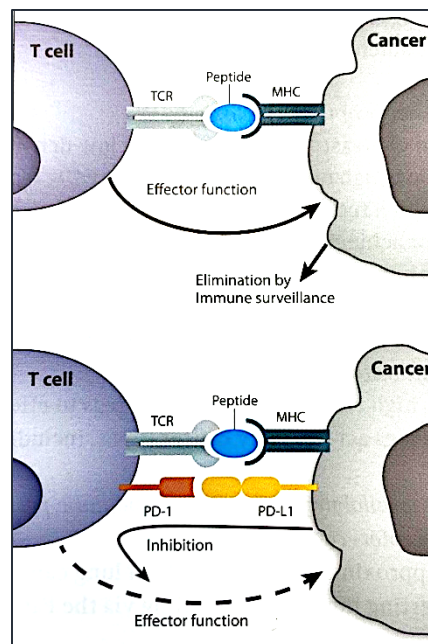


Figura 1. Esquema de la interacción entre PD-1 y PD-L1 en la célula tumoral (tomado de Referencia 5).

Para entender la gran importancia de esta vía, tenemos que saber que la unión de PD-1 (expresado por las células T activadas) y PD-L1 (expresado en células presentadoras de antígenos) explicada, da lugar a un *immune checkpoint* encargado de evitar la autoinmunidad (las células T entran en estado anérgico a partir de la inducción de una muy alta expresión de PD-1 producida por antígenos presentes crónicamente) (5,3).

Centrándonos en la importancia de los “puestos de control”, evitan que las células normales reciban ataques autoinmunes, funcionando como un interruptor (encendido o apagado). Las células cancerosas pueden valerse de estos usándolos a su favor, evitando el ataque del SI (1).

Evitar el ataque por el propio sistema inmune sería una gran estrategia para la supervivencia de las células tumorales. Por ello, lo que ocurre, es que las células cancerígenas expresan PD-L1, burlando de esta manera la función antitumoral (3).

La vía PD-1/PD-L1 como diana sobre la que dirigir la inmunoterapia de distintos tipos de cáncer, ha tenido buenos resultados a nivel de la clínica. Destacamos que dentro de los tipos de **cáncer** a los que nos referimos, está el **de pulmón**, que es sobre el que nos vamos a centrar en este trabajo. Además a día de hoy, las indicaciones en los estadios avanzados (III y IV irresecables) de CPCNP por ejemplo, son estudiar la expresión de PD-L1 (5,7).

Las vías nombradas anteriormente en muchos cánceres se usan para evadir el sistema inmune. La respuesta va a ser el bloqueo de estas con inhibidores de los puntos de control inmunitarios (anticuerpos específicos). Algunos ejemplos de este tipo de inhibidores son el ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, avelumab, durvalumab. Los anticuerpos monoclonales contra PD-1 y PD-L1 son de las inmunoterapias más utilizadas, más adelante se explicará su base y mecanismo (11,13).

Este tipo de terapias han aumentado la supervivencia global de la quimioterapia tradicional (13).

A continuación, se hablará sobre el cáncer de una manera más epidemiológica. En los últimos años, tanto la incidencia como la mortalidad de este han aumentado significativamente (14).

La primera causa de muerte en términos de cáncer a nivel mundial es la pulmonar. Los carcinomas constituyen la mayor parte de las neoplasias malignas pulmonares. Estos se dividen en carcinoma de células pequeñas, y en carcinoma de células no pequeñas. El 85% de estos cánceres son no microcíticos (CPCNP), diagnosticándose la mayoría en etapas avanzadas. Dentro de los **CPNCP** encontramos tres subtipos histológicos, incluyendo dos de ellos, la mayoría de los casos; adenocarcinoma y carcinoma escamoso (3,13).

Respecto al CPCP destacar que se caracteriza, porque a la hora del diagnóstico ya suele estar diseminado. Por este hecho, es interesante marcar que, no se utiliza el sistema TNM para estadificar, sino que los criterios de consenso IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*). Clasificando en dos categorías, localizada y extensa. La primera corresponde a los estadios I al III de TNM, y la segunda al IV (3).

La principal causa productora es el **tabaco**, siendo dentro de este, la intensidad y duración del hábito los principales factores de riesgo. La acumulación de anomalías genéticas combinada con la transformación maligna de las células, siendo esta última producida por cambios epigenéticos y genéticos, es lo que da lugar al carcinoma de pulmón (3).

La quimioterapia con platino sigue siendo la primera línea de tratamiento, pero se han añadido las terapias dirigidas para mejorarla. En este tipo de cánceres se usan como tratamiento estos fármacos inhibidores de los puntos de control inmunitarios, concretamente, dirigidos a la vía PD-1/PD-L1. Esto se debe a que se ha visto aumentada la supervivencia de estos pacientes gracias a las terapias basadas en la actuación sobre el sistema inmune. Se ha visto además, que pacientes fumadores que padecen NSCLC responden mejor a la terapia con PD-1 (1,15,16,17).

Los resultados positivos de estas terapias, aumentan con la **terapia combinada**. Concretamente nos referimos a la combinación con otros tipos de inmunoterapia, como el bloqueo de CTLA-4, o con quimioterapia. Ambas con resultados prometedores, como puede ser la reducción de la carga tumoral con quimioterapia, tienen también sus puntos en contra. (16).

Por un lado, respecto a la terapia combinada con CTLA-4, el problema está en que se ha visto un aumento de severidad y frecuencia de efectos adversos. Por otro lado, haciendo referencia a la combinación con quimioterapia, el asunto está, en que en realidad es incierto que sea beneficioso, las razones que se han encontrado para dudar son entre otras, la inmunosupresión derivada de la inmunoterapia o la elección imprecisa del quimioterápico para conseguir los efectos inmunogénicos (16).

A parte de estos dos tipos de terapia combinada, se está estudiando la combinación con radioterapia y aparentemente con resultados muy prometedores, la terapia combinada con factores angiogénicos (17).

A la hora de combinar tratamientos, hay que investigar todavía sobre el valor predictivo de este biomarcador (8).

Para el tratamiento basado en radioterapia, lo importante sería que como es dirigida a las células tumorales directamente, va a afectar al microambiente tumoral de manera que reclutará células T. El problema radicaría en que no vamos a tener el efecto como en el caso anterior a nivel sistémico. La cuestión es que, los inhibidores de puntos de control inmunológicos mejorarían esa capacidad local de la radioterapia, respondiendo a efectos antitumorales sistémicos. A esto último lo denominamos efecto abscopal (17).

Hay dos formas en las que un tumor puede escapar a la respuesta inmune, una de ellas es la primaria y otra la secundaria. La primera se refiere a pacientes que no responden pero previamente no les había sido administrado un tratamiento; y la segunda pacientes que por el contrario sí habían recibido tratamiento y habían respondido a el, y de repente dejan de responder (18).

De esta forma, hay pacientes que requieren monoterapia y otro que requieren terapia combinada, debido a este escape primario y secundario de la respuesta inmune (18).

En las líneas anteriores se ha hecho una exposición inicial, que luego se hará más extendida, sobre el **ligando PD-L1**. Este, va a ser el centro del trabajo, ya que, como veremos, será un marcador para el posible uso de determinadas terapias. Resumiendo y solo para introducir, en la parte práctica de este trabajo, lo que buscamos es obtener una conclusión sobre la utilidad o no, de la citología como herramienta detectora de expresión de PD-L1 frente a la biopsia, cuya utilidad ya ha sido demostrada. Nos vamos a basar en su uso en el cáncer de pulmón.

Además aprovecharemos y estudiaremos la supervivencia libre de progresión y la total.

PD1/PD-L1.

- **Generalidades.**

PD-L1 se encarga de ayudar a que las células del sistema inmune no ataquen a las sanas en lo que se conoce como **tolerancia inmune**, siendo la base del tratamiento a nivel de esta vía, que hay ciertos tumores, que teniéndolo en un alto porcentaje, engañan al sistema inmune, evadiéndolo, por la expresión de este ligando. Cuando se unen PD-1 y PD-L1 inhiben la activación del linfocito T, inhibiéndose la respuesta normal contra las células cancerígenas (13,19).

Como hemos visto anteriormente, la unión de estas dos moléculas produce una situación de anergia. Esto es debido a que la señalización celular que media el receptor del linfocito T, se ve inhibida, produciendo secundariamente una menor interacción con las células dendríticas y llevando en último punto, a esa falta de reactividad ante los antígenos de las células linfoides (3).

Esta “cadena” explicada hasta llegar a la anergia, es la que se da también frente a los tumores. Explicando así que la unión de PD-1 (presente en la célula T) y de PD-L1 (expresado en las células neoplásicas) sea la responsable de la inhibición de la función antitumoral de los linfocitos (3).

Merece la pena comentar, que PD-L1 es regulado por las células tumorales de dos formas distintas, según el tipo de respuesta inmune. Expresándose en ellas según la tipología de la respuesta también. Uno sería gracias a la respuesta innata, y el otro y más típico, por la respuesta activa. Contando este último con la participación del interferón gamma (12).

Hemos visto el mecanismo por el cual esta vía tiene importancia para las células cancerígenas, por tanto la terapia consistirá en estimular al propio sistema inmune para que reconozca y ataque a las células cancerosas. De esta manera, la inmunoterapia con anti-PD-1 y anti-PD-L1, desencadena la reacción contra el crecimiento del tumor del sistema inmune innato (19).

La clave está en que los anticuerpos monoclonales, bien sean frente al ligando o bien frente a la proteína transmembrana, van a reestablecer el correcto funcionamiento de las células T, por bloquear la unión de estos. El resultado final, es reestablecer la respuesta inmunológica frente al tumor (3).

Es fácil por tanto comprender, que será de ayuda la inmunoterapia en caso de que esta proteína en células cancerosas esté aumentada. Destacar que puede darse la situación en la que tengas niveles altos de PD-L1 y la inmunoterapia no sea eficaz. Para comprobar los niveles realizaremos pruebas, las cuales serán en su mayoría mediante biopsia, habiendo tres tipos; las realizadas por aspiración con aguja fina, con aguja gruesa o quirúrgica (19).

Hay que destacar que el aumento de PD-L1 no se ha visto solo en cánceres de pulmón, sino que también en otro como el de mama, vejiga, riñón, melanoma, linfoma de Hodgkin (19). A pesar de ello, el trabajo se va a enfocar en el cáncer de pulmón.

Dentro de los inhibidores de PD-1/PD-L1 por un lado nos vamos a referir al PD-1; teniendo unos fármacos que le van a bloquear reforzando la respuesta a las células tumorales, pudiendo enlentecer el crecimiento o disminuir el tamaño de algunos tumores. Estos son el nivolumab y el pembrolizumab. Por otro lado, tenemos el atezolizumab, que ataca al PD-L1, pudiendo así ayudar a estimular la respuesta inmune contra las células cancerígenas y así tener efectos como los del nivolumab y el pembrolizumab. Entre los fármacos que atacan a PD-L1 encontramos el durvalumab, utilizándose algo distinto a los otros inhibidores. Este se pauta en personas con cáncer de pulmón no microcítico en etapa III. Son cánceres que no se pueden operar y que no han empeorado tras haberles administrado quimiorradiación. El objetivo es evitar el empeoramiento en el mayor periodo de tiempo posible (**terapia de consolidación**) (1).

La respuesta al bloqueo de PD-1 y su ligando puede verse favorecida si el tipo de cáncer que queremos tratar tiene una alta frecuencia de mutaciones no sinónimas, en lo que se conoce como **carga mutacional**. El cáncer de pulmón no de células pequeñas es un paradigma de elevada carga mutacional y por tanto mayor porcentaje de neoantígenos en la superficie de las células lo que estimula asimismo y potencia la respuesta inmune (18).

Los ligandos de muerte celular programada que se unen a PD-1 son dos; **PD-L1** y **PD-L2**, pertenecientes ambos a la familia B7 y compartiendo el 37% de secuencia homóloga. También son denominados DC274 (B7-H1) y CD273 (B7-DC) respectivamente. Se van a diferenciar en los lugares de expresión, expresándose PD-L1 que es la que más nos interesa, en distintos tipos celulares, destacando las células T. PD-L2 mayoritariamente en las células presentadoras de antígenos (3,5,14).

En esta imagen vemos una representación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 y su unión con PD-1 expresado por la célula T (20).

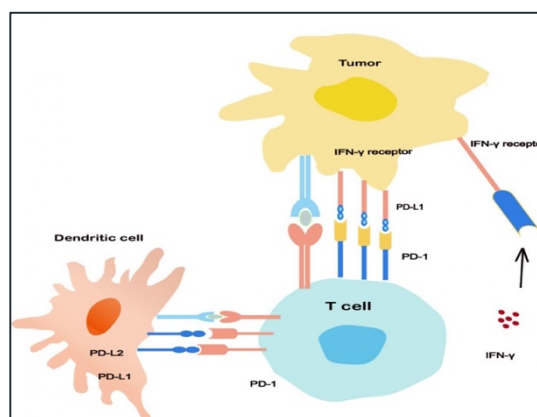


Figura 2. Esquema en el que se representan las interacciones de PD-L1 como de PD-L2 (tomado de Referencia 20).

PD-L2 es un ligando que se parece estructuralmente a PD-L1, como hemos visto. Este último es el dominante, en cambio, PD-L2 puede competir con el por tener mayor afinidad con PD-1. Esto son datos que sabemos, pero no está claro el papel en la inmunosupresión y como un marcador de características clínicas (15).

La función del ligando PD-L2 en la supervivencia de las células T no está igual de descubierto, que el de PD-L1 (21).

Destacar que anti-PD-L1 deja libre a PD-L2 para su interacción con PD-1, mientras que la terapias con anti-PD-1 pueden bloquear las interacciones tanto de PD-L1 como de PD-L2 con PD-1 (15).

Muchas veces se observan diferencias clínicas tanto de la actividad como de los efectos adversos de tipo inmune que surgen por la unión de PD-1 y su ligando. Esto puede tener diferentes causas subyacentes, destacando estos dos; el segundo receptor PD-L2 del que estamos hablando, y la interacción de PD-L1 con CD80. Esto último se debe a que el ligando de PD-1 también se puede unir a CD80 en las células T activadas (21).

Múltiples estudios han demostrado que la expresión de PD-L1 en pacientes con NSCLC, se asocia con mutaciones tanto a nivel de EGFR como de KRAS y reordenamientos de ALK. Esto se basa en que los oncogenes hacen una regulación positiva de la expresión de PD-L1, pudiendo de esta manera el tumor, evadir el sistema inmune del paciente (17).

La aplicación clínica de los inhibidores de PD-1/PD-L1 está limitada por la tasa de respuesta vista en los pacientes. Hay numerosos ensayos sobre el ligando de PD-1 y su relación con la tasa de respuesta terapéutica, y sus resultados cabe decir que no han sido consistentes (8).

Teniendo que destacar que la literatura que podemos encontrar sobre la expresión del ligando de PD-1 es en ocasiones contradictoria y confusa (22).

- **PD-L1 como biomarcador.**

En la **terapia de bloqueo de puntos de control**, para seleccionar pacientes, necesitamos biomarcadores que demuestren el sentido de aplicar la terapia ya que, como en cualquier terapia, habrá pacientes más y menos tendentes a mejorar con ella. Centrándonos en **biomarcadores** para la terapia que estamos explicando, que interviene en la vía PD-1/PD-L1, tenemos la expresión de PD-L1 (no binaria). Este se ha convertido en un biomarcador muy importante. Hay que añadir, que a pesar de ser aparentemente el más importante, no es el único que se está estudiando, destacan también los biomarcadores plasmáticos y la carga mutacional por ejemplo (15,17,23).

Hay diferentes aspectos que un biomarcador tiene que tener en cuenta. Entre ellos, destacan que sea reproducible, la tipología de la muestra, la tinción... (4).

Como objetivos a futuro, debemos destacar el desarrollo de **algoritmos** para el uso de diferentes anticuerpos, que como ya se ha dicho, tienen mucha importancia y son básicos para la efectividad de estas terapias (10).

Para el trabajo lo importante es que, PD-L1 es el principal biomarcador estudiado para el cáncer de pulmón cuyo tratamiento va a estar basado en la inmunoterapia. Es muy importante y básico, que para la definición de PD-L1 como biomarcador, se defina cuándo se considerará su expresión positiva y los anticuerpos que está validados (3,16).

El interés sobre la expresión proteica de este ligando, radica entonces, en mostrar qué pacientes responderán mejor a la inmunoterapia. Para ello, y por la importancia que está cobrándose, el desarrollo de guías para la correcta resolución de la fase preanalítica y para conocer los distintos factores influyentes, son fundamentales. Siendo entre obligatorio y recomendado la realización de la prueba de PD-L1 para guiar las decisiones sobre el tratamiento (15,24).

A pesar de que este sea el principal interés sobre este biomarcador, no se ha llegado a una conclusión final sobre la relación entre la expresión y la eficacia del tratamiento. La base de estas dudas, es que se han visto buenos resultados aun con expresión de ligando negativa. Por tanto, los **resultados** sobre el valor pronóstico de PD-L1 continuando siendo **controvertidos** (15,23).

Por ello, no todo son ventajas, ya que como ha sido indicado los resultados no son claros si nos referimos al pronóstico. Podemos achacar esto a diferentes causas, entre ellas están el hecho de que la expresión de este ligando varía entre las diferentes cohortes de cáncer pulmonar, o al uso de técnicas de inmunohistoquímica no estandarizadas para medir el ligando en los distintos tejidos. Diferentes compañías han desarrollado anticuerpos para detectar el ligando (15).

Hay que tener en cuenta también como factores que añaden variabilidad a los resultados, por un lado, el procesamiento y almacenamiento en los tejidos, pudiendo alterar la capacidad de detección de PD-L1 en los tumores. Por otro lado, el aumento de expresión de ligando que podemos ver, debido al previo tratamiento con quimioterapia (15).

Además de los factores que clasificaríamos como externos, la expresión de PD-L1 también se va a ver muy afectada por la heterogeneidad intra-tumoral y la expresión dinámica del ligando (16).

Hablando de la importancia de la heterogeneidad tumoral, tenemos que hablar también, de que las células del tumor van a poder variar con el potencial de metástasis (3).

La expresión del ligando en los distintos tumores se ha estudiado mediante **técnicas inmunohistoquímicas**. De esta manera, se seleccionan los individuos más predispuestos a obtener resultados positivos de los inhibidores de esta vía PD-1/PD-L1 (5).

La **inmunohistoquímica** o IHC es una técnica por la cual se visualizan proteínas en muestras de tejidos. De forma similar, existe la **inmunocitoquímica**. Esta última se podría decir que es la misma técnica, pero basándose en una muestra citológica (5).

La visualización de las zonas de la muestra teñidas, se observa por medio del microscopio. Las zonas que pueden teñirse con esta técnica pueden ser desde la membrana celular, hasta el núcleo o el citoplasma (5).

De manera sintética, se expone un análisis de las fases en la aplicación de las técnicas de inmunohistoquímica centrado en PD-L1 (5).

- *Fase preanalítica.* Hay varias recomendaciones con respecto a esta fase, centrándose en unos parámetros para la preparación de la muestra y su almacenaje posterior. La modificación de estos, puede a su vez modificar los resultados y por tanto, su validez. Los parámetros para una fase preanalítica adecuada que se han definido son los siguientes:
 - Tiempo de isquemia fría.
 - Fijación.
 - Preparación.
 - Almacenaje.
 - Descalcificación (5).
- *Fase analítica.* En esta fase es en la cual hay que optimizar y controlar una serie de puntos para que los test comerciales detectores de PD-L1 tengan validez clínicamente hablando. De la misma manera, se consigue estandarizarlos, que es lo que se busca en los diferentes estudios (5).
- *Fase postanalítica.* Para la validación de los resultados va a haber diferentes interpretaciones y/o criterios según la aplicación y la respuesta a un determinado tratamiento. Hay ciertas variables a tener en cuenta y que tiene que tener en cuenta el laboratorio, para tener unos resultados válidos (5).

El trabajo con inmunotinción sobre muestras citológicas para la detección de PD-L1 puede dar lugar a falsos negativos si su fijación se basa en el uso de alcoholes. Sin embargo, si los fijadores tienen base con formalina, habrá una mayor concordancia con las muestras histológicas. Este efecto del alcohol puede solucionarse en cierto grado si utilizamos formalina para una postfijación (25).

Cada laboratorio usó su propio anticuerpo, estudiándolo cada uno con un determinado fármaco. Por tanto, va emparejado cada clon con un test concreto basado en la técnica inmunohistoquímica. Esta expresión del ligando tanto en células inmunes infiltrantes tumorales como en las propias células tumorales ha sido validado por la FDA (3,26,27).

Concretamente la FDA ha reconocido el uso de **cuatro anticuerpos anti-PD-L1** hasta el momento y de **cuatro estudios inmunohistoquímicos**. Las dos plataformas inmunohistoquímicas usadas son Ventana y Dako. Los anticuerpos son SP142, SP263, 22C3 y 28-8 (27).

Según el clon de anticuerpo de ligando que se use, va a unirse al dominio intra- o extra- celular (3).

Fármaco	Clon anticuerpo diagnóstico del ligando
Nivolumab	28-8 (Dako → Agilent)
Pembrolizumab	22C3 (Dako → Agilent)
Atezolizumab	SP142 (Ventana)
Durvalumab	SP263 (Ventana)
Avelumab	73-10 (Dako → Agilent)

(5). Adaptado de la referencia 5, Dako ahora es Agilent.

Sobre lo expuesto en la tabla y como se ha indicado, destacar que los anticuerpos 22C3, 28-8 y SP263 tienen un dominio de unión al ligando extracelular. Mientras que el SP142 citoplasmático y el 73-10 desconocido (5).

Esta no es la única diferencia importante entre ellos, sino que el **criterio de positividad del ligando** también tiene relevancia. Se expone a continuación a modo de lista la correlación fármaco – anticuerpo con el criterio de positividad (5).

- **Pembrolizumab (22C3)** → $\geq 50\%$ células tumorales.
- **Nivolumab (28-8)** → $\geq 1\%$ células tumorales.
- **Durvalumab (SP263)** → $\geq 25\%$ células tumorales.
- **Atezolizumab (SP142)** → células tumorales y/o células inmunes.
- **Avelumab (73-10)** → $\geq 1\%$ células tumorales (5).

De la tabla, los 4 primeros coinciden con los más típicos. Además según los estudios que se están realizando para la “estandarización” del uso de anticuerpos parece que son comparables el 28-8, SP263 y el 22C3 (12,17).

Hemos visto por tanto, que hay cinco anticuerpos monoclonales distintos para el estudio de la expresión de PD-L1. Su uso está relacionado con las muestras de tejido que han sido incluidas en parafina y fijadas en formol, es decir, solo han sido validados estos anticuerpos en muestras tisulares (7).

Lo importante y al final en lo que se diferencian, es en que cada anticuerpo monoclonal se une a una parte diferente de la proteína del ligando. Esta parte se denomina epítipo y la unión es específica por parte de cada anticuerpo (5).

Los estudios existentes hasta el día de hoy, no reflejan que los distintos test inmunohistoquímicos para la detección de PD-L1, sean intercambiables desde un punto de vista metodológico (28).

Sobre los clones y los test destacar, que **no** existe un **estudio comparativo final**, que la comparación entre los diferentes ensayos es complicada, no sabemos hasta que punto son intercambiables y carecen de uniformidad. Habiendo diferentes causas por las que puede haber diferencias entre ellos. Siendo importante entre ellas el que cada uno tiene su propio sistema de puntuación. Necesitamos estandarizar los ensayos para desarrollar guías (3,27).

A continuación, se presentan muestras obtenidas mediante EBUS, en las cuales se han usado dos de los anticuerpos que hemos hablado. En las tres primeras se ha usado el anticuerpo monoclonal 22C3, con una expresión de PD-L1 del 90%. Mientras que en las tres siguientes se ha usado el SP263, teniendo un 10% de expresión del ligando.

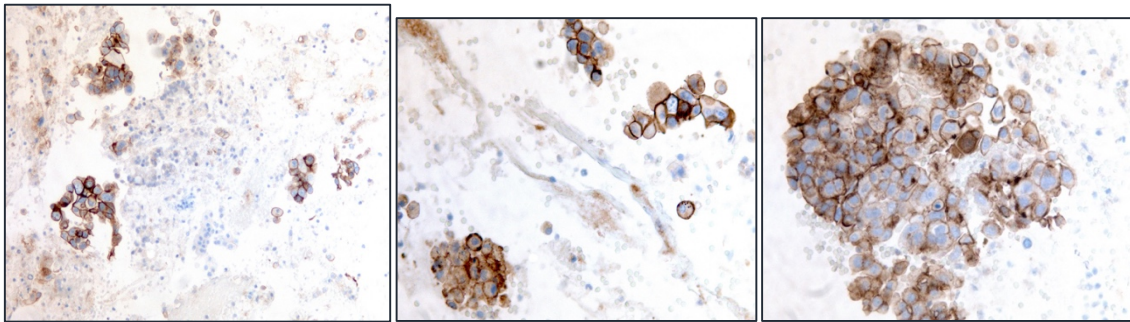


Figura 3 (3.a, 3.b, 3.c). Muestras de pacientes con cáncer de pulmón, extraídas mediante técnica EBUS y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas usando el anticuerpo monoclonal 22C3.

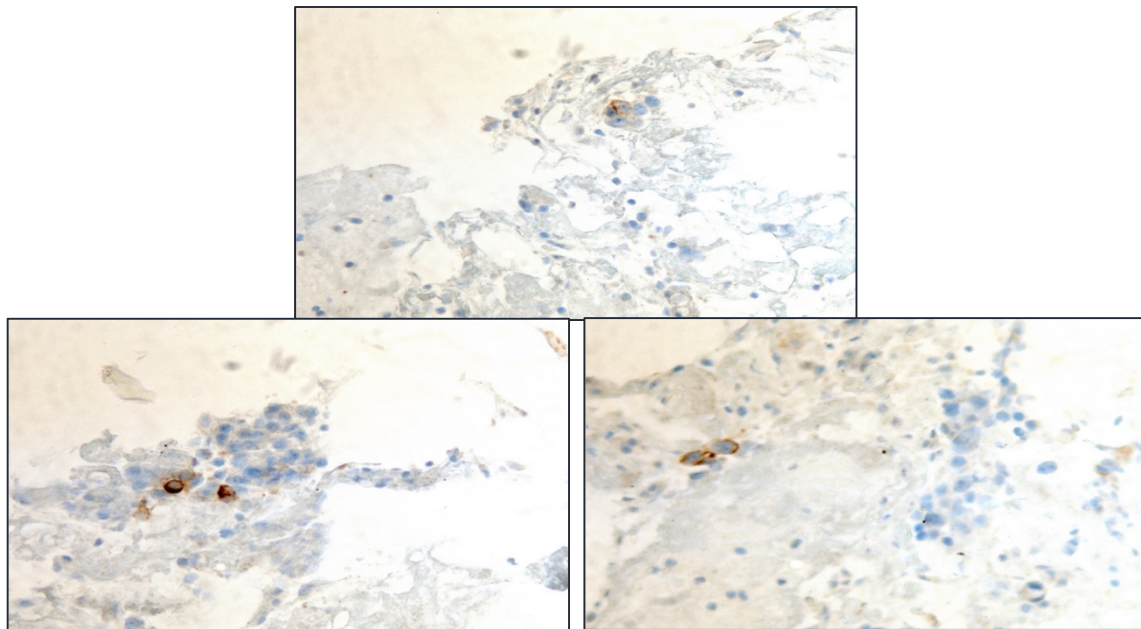


Figura 4 (4.a, 4.b, 4.c). Muestras de pacientes con cáncer de pulmón, extraídas mediante técnica EBUS y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas usando el anticuerpo monoclonal SP263.

Con el objetivo de encontrar esta estandarización, cabe hablar a continuación del **proyecto Blueprint**. Este consiste en un proyecto en el que se estudia de manera comparativa los distintos ensayos existentes acerca de PD-L1 tratado con técnicas inmunohistoquímicas. Se pretende sacar conclusiones sobre la comparabilidad entre los distintos ensayos inmunohistoquímicos existentes. Por tanto, la evaluación de las similitudes analíticas y las diferencias entre los sistemas de PD-L1, es la clave base del proyecto. Se buscaba la utilización de la misma muestra de tumor de un paciente con cáncer de pulmón de células no pequeñas, para comparar así las tinciones de los cuatro ensayos comercializados (5,29).

En este estudio no se buscó hablar de la inmunoterapia en sí. Sino que se quería ver la expresión del ligando comparando con los puntos de corte de cada ensayo, si estaba por encima o por debajo (5).

Estos datos consecuentemente, llevan a la selección de la terapia. El riesgo que se quiera correr es al final lo que define la armonización entre los ensayos. Se calcula en torno a un 5 y un 15% de pérdida del valor predictivo (5).

En los resultados se vio que el menos comparable con los demás era el ensayo SP142. Mientras que SP263, 22C3 y 28-8 sí son comparables entre ellos (29).

Blueprint es una colaboración entre la AACR (*American Association for Cancer Research*) y la IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*). Además de junto a 2 compañías diagnósticas y 4 farmacéuticas. Las primeras son Ventana/Roche y Dako/Agilent; y las segundas Genentech/Roche, AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Merck & Co., Inc (29).

En cuanto a los **patrones de tinción** en inmunohistoquímica, tenemos dos para la expresión del ligando de muerte programada. Son el patrón citoplasmático y el patrón membranoso, este último es el más valorado. A pesar de ello, esto supone otro factor de variabilidad, según cual se use o se de mayor valor (3).

Antes se ha expuesto que la expresión de estas proteínas se puede dar no solo en las células neoplásicas, sino que también en los linfocitos infiltrantes del tumor. Por ello, se está viendo la posibilidad que como biomarcador para seleccionar a los pacientes más apropiados para esta terapia, no se use solo la expresión en las células del tumor propiamente dichas, sino también en el **microambiente tumoral** (3).

El patólogo Sanjay Mukhopadhyay, en un pequeño vídeo explicativo acerca de la interpretación de la expresión de PD-L1 en muestras estudiadas con inmunohistoquímica, resalta las claves a tener en cuenta. Destacar que en el vídeo hace hincapié en que está hablando del CPCNP habiendo realizado la inmunotinción con el clon 22C3 (30).

A modo de lista, lo más importante a valorar es:

- Dejar constancia de la proporción de células del tumor que presenten expresión del ligando PD-L1. Coloco en primer lugar este punto, porque es la información más importante clínicamente hablando.
- El resultado es positivo si se han teñido las membranas pertenecientes a nuestra muestra.
- La tinción de la muestra va a variar de intensidad (también dentro del tumor), sin restar valor a la positividad en la expresión.
- Solo van a tener valor las células tumorales en el CPCNP.
- Tener cuidado porque la expresión de ligando puede ser positiva en macrófagos y negativa en células tumorales. Dificulta la interpretación (30).

La respuesta a la terapia frente a este punto de control, se está viendo que posiblemente se ve influenciada por otros puntos de control. Además de afectar a la respuesta frente a la inmunoterapia, podrían llegar a usarse como marcadores. Entre ellos destacan EGFR, PD-L2, interferón gamma y RNA mensajero de genes de respuesta inmune (3).

Centrándonos en la importancia de cada uno de ellos por separado:

- *EGFR*: Ha sido estudiada y evidenciada la relación entre mutaciones en este receptor y la presencia de PD-L1.
- *PD-L2*: la expresión de este ligando parece ser significativa en las respuestas de los tratamientos. Por un lado, parece que puede esclarecer casos de respuesta al tratamiento aun siendo negativa la expresión de PD-L1, y por otro lado, parece que influye en la respuesta al pembrolizumab.
- *Interferón gamma*: parece servir de biomarcador para predecir la respuesta al durvalumab (3).

En la próxima generación de biomarcadores será de máxima importancia preguntarse por la **naturaleza inflamatoria del microambiente del tumor**, a diferencia o además de cómo hasta ahora, de la carga mutacional (considerada mayormente predictiva, no biomarcador pronóstico) y de PD-L1. Los test incluyen análisis transcriptómicos o análisis de imágenes. Se permitirá así, desarrollar las herramientas mejoradas para encontrar a esos pacientes más predispuestos a un beneficio con estas terapias (16).

Otro indicador de valor predictivo es la **microbiota intestinal**. Además, también podemos hablar de biomarcadores a nivel de la **sangre periférica**. Esta comparándola con una muestra de tejido tiene menos heterogeneidad y hay mayor disponibilidad (8).

En cuanto a marcadores en sangre periférica, podemos hablar de una **forma** de PD-1 y su ligando diferente a la transmembrana, esta es la **soluble**, sPD-1 y sPD-L1. Hay estudios que han demostrado su existencia (8,14).

Sus funciones exactas no están todavía definidas, pero claramente aumenta la complejidad de esta vía. Representan elementos imprevistos que contribuyen también a la respuesta por parte del sistema inmune (14).

Esta forma soluble si tiene sus niveles incrementados de forma previa al tratamiento, se relaciona con un pobre pronóstico. Cuando sus niveles aumentan de manera rápida tras la terapia dirigida a los *immune checkpoints* indica una potente respuesta hacia el tumor. Por tanto, sus niveles en sangre deberían facilitar la predicción, entre otras cosas, de la respuesta al tratamiento (8, 14).

Por tanto, podemos concluir que sPD-1/PD-L1 nos da nuevos marcadores, además de una visión sobre las estrategias del tratamiento (14).

- **Fármacos.**

La FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó por primera vez la inmunoterapia para el cáncer de pulmón en marzo del 2015 (16).

La terapias que se dirigen a la vía PD-1/PD-L1 tienen dos anticuerpos dirigidos al ligando y dos al receptor, estando ambos aprobados por la FDA y la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento de este tipo de cáncer. Respecto al primero tenemos el durvalumab y el atezolizumab, y respecto al segundo el pembrolizumab y el nivolumab (17).

En la figura 5 se puede ver una representación de estos anticuerpos monoclonales según si actúan en PD-1 o en su ligando.

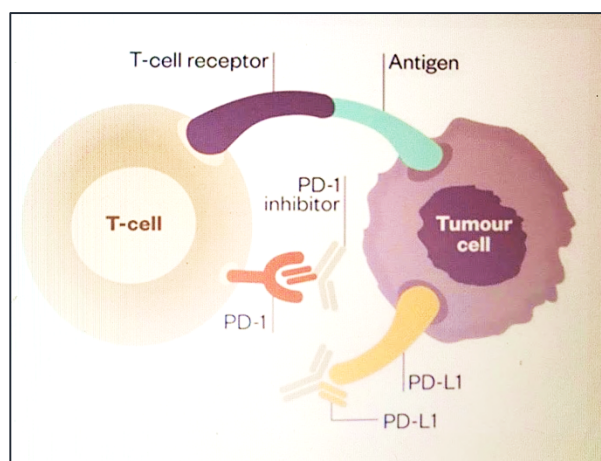


Figura 5. Representación de la interacción de PD-1 y su ligando con sus respectivos anticuerpos monoclonales (tomado de Referencia 23).

Muy buenos resultados han sido obtenidos al tratar el CPCNP con inmunoterapia basada en la vía PD-1/PD-L1, concretamente con estos anticuerpos monoclonales. Habiéndose obtenido respuestas duraderas (31).

Los grandes beneficios obtenidos con la terapia frente a la vía PD-1/PD-L1 se han visto en pacientes con alta expresión de ligando tanto en las células tumorales, como en las infiltrantes de tumor. Dependiendo este beneficio terapéutico del tratamiento sistémico previo y de la expresión de PD-L1 (28,32).

Entre estos pacientes, la mayoría de los que presentan cáncer de pulmón de células no pequeñas, son en alguna medida expresores de PD-L1. Además, alrededor de un cuarto de ellos serán altos expresores. Es decir, expresarán el ligando en sus células en un porcentaje igual o superior al 50% (28).

Estos pacientes que el punto de corte es el 50% hacia arriba y que como hemos visto son denominados altos expresores, son los que mayor respuesta presentan a la terapia dirigida contra este punto de control (28).

Todo no son puntos positivos. El problema de esta terapia es que, si es aplicada como monoterapia, los resultados positivos solo serán de alrededor el 20%. Otro punto negativo es el hecho de que puede producir efectos adversos relacionados con la respuesta del sistema inmune, por ello, entre otras razones, es importante saber cuáles se beneficiarían con esta terapia con el papel de los biomarcadores, como se ha explicado (17,31).

Además, el problema de esta terapia, es que no es tan clara como otras. En el sentido de que no es una “acción – reacción”; expreso el ligando es efectiva la terapia. Se ha visto que pacientes cuyas células tumorales no expresan este ligando, sí responden a la terapia con anticuerpos monoclonales dirigidos a PD-1 o a PD-L1. Mientras que pacientes cuya expresión está en el rango de altos expresores, no responden (28).

Estas terapias dirigidas detienen la proliferación de las células T, la actividad citolítica de *PD-1-positive T cells* y la liberación de citoquinas. Entre los objetivos de esta terapia, está la posibilidad de mejorar la **capacidad de las células T** en el reconocimiento y posterior eliminación de las células tumorales. De esta manera, se reestablecerá una de las funciones del sistema inmune, la de vigilancia (17).

Los test de inmunohistoquímica para detectar PD-L1 no se usan para excluir a los pacientes del tratamiento con estos anticuerpos, sino para dividirlos en los que se usará como primera o como segunda línea esta terapia (28).

Hay que prestar atención a las **resistencias** a la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1. El mecanismo es todavía desconocido (17).

Vamos a hablar de los fármacos dividiéndolos según, si son inhibidores de PD-1 o de PD-L1. Hasta el momento, no se ha demostrado la ventaja de uno sobre otro (5,23).

Los **inhibidores de PD-1:**

1. Pembrolizumab.

Evita la unión con PD-L1 y PD-L2 (16).

Este fármaco es un anticuerpo monoclonal PD-1 del tipo IgG4, isotipo kappa (5).

Ha sido aprobado para distintos tipos de cáncer, pero lo que nos interesa es su efectividad en **cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado**. Hay que destacar que se ha visto mayor respuesta con este tratamiento en **personas fumadoras**. Además de una relación directa en la respuesta de su uso con la **expresión del ligando** de PD-1 (5).

Tanto si hablamos de la respuesta, como si hablamos de la supervivencia libre de progresión, es mejor con este fármaco que con quimioterapia, según se ha visto en los diferentes estudios. Además de disminuir las reacciones adversas (5).

Aprobado por la FDA como **primera línea de tratamiento en pacientes con alta expresión de PD-L1**. De esto es importante destacar que se usa como terapia en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, pero con el requisito de que el estudio previo de expresión de PD-L1 en el paciente haya sido positivo (5,27).

Se ha expuesto que lo vamos a usar como primera línea de tratamiento si la expresión del ligando es superior al 50 %. En caso de no ser así, o a pesar de la expresión, para seguir siendo de primera línea habría que combinarlo con carboplatino / pemetrexed en el cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico no escamoso (27).

2. Nivolumab.

Este fármaco se usa en el tratamiento del melanoma, y es eficaz en distintos tumores sólidos. De este último grupo vamos a destacar el **avanzado de pulmón de células no pequeñas**, viendo resultados más prometedores en la supervivencia a nivel global que con quimioterapia. De hecho, se aprobó para pacientes con este tipo de cáncer que ya han llegado a fase metastásica y que además, ha progresado la enfermedad mientras eran tratados, o después de serlo con quimioterapia (5).

Este fármaco es un anticuerpo monoclonal del tipo IgG4. Su método de actuación se basa en la unión a PD-1, bloqueando así que sus ligandos se unan. En este caso se habla de ligandos en plural, porque también afecta a la unión de PD-L2, no solo PD-L1. Como resultado, se reestablece la función antitumoral del sistema inmune (5).

Se estudió si la expresión del ligando de muerte celular programada podría utilizarse como biomarcador para el uso de este fármaco, pero en contraposición, hemos visto buenos resultados en pacientes PD-L1 negativos. Por tanto, su uso fue aprobado sin tener en cuenta la expresión de ligando, ya que en estos pacientes, como se ha indicado, **la expresión del ligando no ha demostrado ser predictiva** (4,27).

Es un buen fármaco para la duración de su respuesta y por su seguridad para el cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico como **segunda línea de tratamiento**. No habiendo sido aprobado como primera línea terapéutica (27).

La FDA aprobó el uso del nivolumab y el pembrolizumab en el cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, que ya hubiese sido anteriormente tratado (27).

Los **inhibidores de PD-L1**, destacan por su actividad entre otros, frente a CPCNP (5).

1. Durvalumab.

Se usa como **primera línea**, a pesar del estadio de expresión de PD-L1 en la fase I y II de este cáncer. Ha sido aprobado por la Agencia Europea del Medicamento en los casos en que la **expresión de ligando sea mayor o igual al 1%**. En estos pacientes a mejorado la supervivencia libre de progresión (5,17,25).

Este fármaco se encarga no solo de bloquear la interacción del ligando con PD-1, sino que también con CD80, presentes ambos en las células T (5).

Destacar en este fármaco, que en el cáncer escamoso la tasa de respuesta objetiva es mayor que en el no escamoso (27).

2. Atezolizumab.

Se dirige a PD-L1 solo. Se aprobó en el 2016 para tratar el **CPCNP metastásico**. Se aprobó como **segunda línea** si había **expresión de PD-L1** en los tejidos en pacientes con este tipo de cáncer (16,17).

Tras su tratamiento se han visto mejoras en la supervivencia tanto con altos como con bajos o casi negativos porcentajes de expresión de ligando (27).

Destacar que en el ensayo correspondiente a este fármaco, se recalca la importancia del reactivo que hay que usar como control, ya que la variación de este puede conducir a resultados no válidos (5).

3. Avelumab.

Los estudios son prometedores. Parece que muestran más eficacia o actividad en pacientes con expresión de PD-L1, pero está todavía **en desarrollo** (5).

Pasa lo mismo con la expresión de PD-L1 que con el fármaco anterior (27).

Estos últimos tres tipos de fármacos, son del tipo IgG1 (5).

- **Detección de la expresión de PD-L1.**

En este trabajo, se trata de comparar las muestras citológicas con las de biopsia, para ver la posible utilidad o incluso superioridad de la primera con respecto a la segunda. En la parte de estudio que viene en el siguiente apartado, se expondrá el análisis que se ha hecho con pacientes del HUMV. En este apartado, lo que se ha visto en distintos estudios o revisiones acerca del tema.

A continuación se expone primero la información disponible acerca del uso de citologías como medio de detección de la expresión del ligando de PD-1 por parte de los pacientes oncológicos. Tras esta pequeña exposición, se comparará esta técnica no aprobada actualmente para este fin, con la sí aprobada y establecida como son las biopsias.

Tenemos que tener en cuenta que el **tipo de muestra** es muy importante. Diferentes estudios han mostrado diferencias en la expresión de PD-L1 en función de la muestra. Dentro de las causas principales, ya destacamos la heterogeneidad tumoral. No olvidar por tanto, las causas derivadas del procedimiento (3).

Además, al estudiar la expresión de PD-L1, hay que tener en cuenta, que después de tratar el tumor, puede verse modificada, es variable (4).

- **Citologías.**

Cada día es más importante para estudiar los biomarcadores el uso de las citologías. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, este tipo de muestras ocupan un rango de entre el 30% y el 60%. Esta importancia radica en que, este tipo de cáncer, suele diagnosticarse en **estadios avanzados**, buscándose **procesos mínimamente invasivos**. Citologías, en un porcentaje no desdeñable y/o biopsias pequeñas (7).

Ninguno de los ensayos de los que hemos hablado antes ha sido validado para la técnica citológica. A pesar de ello, es remarcable que entre el 30 y el 40% de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas se diagnostican únicamente por medio de citologías (5).

La base del uso de procesos poco invasivos es que, en los estadios ya avanzados en lo que se suele diagnosticar, la cirugía ya no es posible (7).

La base de el uso de este tipo de muestras está en estudios de tipo retrospectivo, tanto de correlación con beneficios obtenidos al tratar al paciente con inmunoterapia, como de validación técnica (7).

Las muestras citológicas vamos a clasificarlas en dos grupos según su procesamiento, sufriendo uno y otro por distintos factores y además, necesitándose así estrictos **protocolos**, tanto de control de calidad, como de optimización y validación. Las dividiremos en;

- *Muestras citológicas no parafinadas* (citología líquida, extensiones citológicas).
- *Muestras citológicas parafinadas* (bloques celulares) (7).

En esta tabla se exponen las ventajas y desventajas del bloque celular frente a las citologías no parafinadas (7).

Ventajas	Desventajas
Técnica fácil.	Más costes y trabajo técnico.
Preanalítica común.	Tardanza en el diagnóstico.
Reproducible.	Procesamiento con variabilidad técnica.
Reconocimiento arquitectónico.	Menor celularidad.
Biobancos.	Falta de integridad celular -> menos ADN.
Conservación de material residual.	Artefacto de fijación y parafinización.

Una cosa a tener en cuenta de la **fase preanalítica** (la cual cuenta además con subfases) es que si se retrasa la fijación, la expresión en las membranas del ligando se verá reducida (7).

A pesar de tener esta clasificación, y aparente posible utilización, según guías recientes, la principalmente usada a día de hoy, es la **muestra parafinada o bloque celular**. Esto tiene su base, en que su tratamiento es semejante al de las muestras tisulares (7).

Sin embargo, han sido vistos positivos resultados en el estudio de biomarcadores, combinando las parafinadas con las no parafinadas (7).

El bloque celular tiene una sensibilidad por debajo de la del estudio citológico único. La cuestión es que como puede usarse con técnicas como la inmunohistoquímica, aumenta la sensibilidad diagnóstica (7).

En cuanto a la optimización de la obtención de este tipo de muestras, tenemos que destacar el **método ROSE** (*Rapid On Site Evaluation*). Este es recomendado en las PAAF (Punción Aspiración con Aguja Fina). Siendo esta guiada por un método de imagen, como puede ser TAC o EBUS. A su vez, hay estudios en los que no se han demostrado diferencias relacionadas con el calibre de la aguja para realizar la técnica con respecto a los resultados válidos de expresión del ligando (7,33).

Los estudios hechos mediante EBUS y llevados a cabo con el método ROSE, son los de mayor sensibilidad. Una de las ventajas de este método es que permite un buen manejo de la muestra, y disminuye a porcentajes mínimos los falsos negativos (7).

El uso de **EBUS** para la aspiración transbronquial en el diagnóstico y el posterior estadiaje de pacientes con cáncer de pulmón, se ha vuelto la técnica de elección como se ha visto en diferentes pautas de actuación (33).

El diagnóstico citológico por medio de **aspiración por aguja fina** podría ser de elección antes que una biopsia por ser menos invasiva (25).

A la hora del diagnóstico la mayor parte de los casos de cáncer de pulmón están avanzados o ya han metastatizado. Por ello es por lo que se trata de usar técnicas mínimamente invasivas para su diagnóstico, como ha sido indicado en diversas ocasiones. Siendo una de las alternativas para esta mínima invasión, las aspiración con aguja fina mediante EBUS, obteniendo una muestra citológica. Esto refuerza lo dicho en el apartado anterior sobre la importancia de estas técnicas (31).

El uso de las citologías en estos procedimientos está aumentando ya que, como se ha dicho se buscan procedimientos mínimamente invasivos, siendo la citología la candidata. En contra está el punto que todavía no hay los suficientes estudios para validar esta opción (32).

La cuantificación de la positividad para la expresión de PD-L1 en muestras citológicas tiene distintos desafíos. Entre ellos se destaca la falta de arquitectura tisular, impidiendo la distinción entre las células inmunes que están dentro del tumor y son las que interesan, de las que están fuera y no tienen valor para la detección del ligando (5).

En cuanto a las ventajas, y en cuanto a lo que al buen manejo de la muestra concretamente, se refiere sobretodo al análisis molecular y los estudios complementarios de inmunohistoquímica. Va a darnos también una impresión de diagnóstico, que dirigirá a la zona más adecuada (7).

La Asociación Canadiense de Patólogos, publicó en 2019 unas guías en las cuales indicaban el uso de la técnica del bloque celular sobre la extensión citológica para el estudio de la expresión de PD-L1 en los tumores. Es decir, como técnica de estudio del ligando como biomarcador. La base de esto es, como hemos visto antes, la fase pre-analítica, ya que la técnica del bloque celular la comparte con las biopsias, cuyos requisitos pre-analíticos están validados (7).

Un bloque para diagnóstico debe constar de 50 células tumorales. Hopkins et al establecieron el mínimo en 100 células tumorales (7).

Muy importante que el resultado siga las políticas del laboratorio; pero este no es el único que debe seguir una pauta, sino que los resultados sobre el ligando reflejados en el informe también. Destacan 3 parámetros de calidad:

1. Cumplir la política de calidad del laboratorio.
2. Periodo entre una semana y diez días para obtener el resultado.
3. Contenido del informe (7).

○ **Citologías frente a biopsias.**

Los factores que pueden provocar que no haya correlación entre las muestras de tejido o celulares son:

- La variabilidad entre los observadores en la muestras de células.
- La heterogeneidad espacio – temporal.
- Pre-analítica no estandarizada (7).

Previamente a que a pesar de los buenos resultados, sea validada la citología como técnica diagnóstica en este caso, es preciso el desarrollo de unas pautas y unos controles rigurosos (6).

La manera en la que se recomienda corregir la heterogeneidad tumoral es con muestras más amplias. De esta manera se puede dividir, midiendo el porcentaje de positividad por separado y obtener la media. Siendo esta última el resultado (5).

Como se ha indicado, puede haber falsos negativos en función del **tipo de fijador** usado en la muestras. Esto es importante ya que, las muestras histológicas se basan en fijadores con formalina, mientras que las citológicas en distintos alcoholes (25).

Las muestras citológicas y su concordancia con las histológicas validadas, depende por tanto, del modo en que sea procesada la muestra, variando así su grado de tinción y por lo tanto de expresión que vemos, dando a errores o no en la interpretación (25).

Lo que puede explicar las diferencias en la tinción de las muestras es que, ambos tipos de fijadores, tienen diferentes efectos en la estructura de las proteínas, concretamente en la terciaria (25).

Entre los pacientes que padecen CPCNP, en alrededor del 30 – 40% solo disponemos de muestras citológicas para el análisis de biomarcadores, la estadificación y el diagnóstico. A pesar de ello, todos los ensayos inmunohistoquímicos comercialmente disponibles han sido validados para muestras histológicas. Aún así, las citologías rápidamente se están aceptando en la práctica clínica (24).

Por tanto, como vemos, dentro de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, un porcentaje no desdeñable se diagnostica por medio de una citología. A pesar de ello, en los ensayos clínicos del ligando, no se suelen incluir, siendo mayoritariamente basados en material histológico (26).

Para su uso para ver la expresión de PD-L1 e interpretar los resultados de manera que se consideren de confianza, necesitamos que la muestra sea la suficiente, es decir, la representación tumoral tiene que ser suficiente. Por ello nunca nos podemos olvidar ni de la representación tumoral ni del tamaño de nuestra muestra. Según lo que hemos visto antes, para cumplir este requisito deberá contar con un mínimo de 50 o de 100 células, según los autores, siendo lo que se acepta generalmente. Tampoco olvidar que depende también del anticuerpo que hayamos usado (7,24).

A pesar de ser las mínimas células necesarias, las mayores correlaciones se han encontrado con citologías de más 100 células viables (recalco células tumorales) (7).

De esta manera, y como consecuencia de lo anterior (como si fuese un círculo vicioso), las citologías no son recomendadas por no haber estudios que las avalen (26).

En una revisión sistemática de varios estudios para comparar la posible concordancia entre la utilización de histología o citología para ver la expresión de PD-L1 en pacientes con CPCNP se vio, que no hay evidencias que muestren la técnica citológica como inferior o inadecuada con respecto a la histológica, para la evaluación de este ligando. Los resultados concordantes fueron buenos teniendo en cuenta dos puntos de corte para el anticuerpo 22C3. Un porcentaje mayor o igual a 1 y mayor o igual de 50 (24).

El uso de la técnica citológica tiene muchas ventajas, destacando; ser menos invasiva y a su vez muestrear múltiples zonas en un único procedimiento. A esto hay que añadirle que ha sido aprobada para la detección de reordenamientos de ALK o ROS1 y para la detección de mutaciones de EGFR. Esto último es muy importante, ya que, como se expuso anteriormente, la expresión de PD-L1, se ha asociado con mutaciones y reordenamientos en estos oncogenes (17,24).

Entre los beneficios del uso de citología en vez de biopsias, destacan la satisfacción del paciente, el coste y el tiempo (33).

Usando como técnica la citología, se prevé que sea excepcional la aparición de falsos positivos, pero si que es verdad, que puede en algunos casos subestimarse los valores (24).

La revisión apoya el uso de citologías para este fin. Esto no quiere decir que no se incluyan muchos **retos** dentro del procedimiento. Por ejemplo, por un lado, tenemos que la expresión membranosa de PD-L1 es menos clara mediante citología que cuando tenemos un bloque de tejido. Por otro lado, si comparamos entre ambas técnicas la dispersión de las células, debemos hacer un rango de puntuaciones, siendo especialmente complicado cuando se encuentran bajos niveles de expresión de PD-L1 y cuando se aplica al punto de corte mayor o igual a 1% (24).

Además de los retos o problemas del apartado anterior, hay que contar con los referidos al manejo de la muestra. Para su manejo se usa un amplio abanico de fijadores. Otra cosa a tener en cuenta es la solución para la preservación que se usa previo a la fijación. En cuanto a esto no hay acuerdo entre los estudios según si influye o no a la expresión de PD-L1. Hay estudios con resultados en una dirección, y otros con resultados en la otra, pareciendo este asunto no concluyente (24).

Las publicaciones referentes a PD-L1 y su estudio, ponen de manifiesto el uso de la muestra citológica parafinada (bloque celular) en la determinación del ligando. El estudio sobre este tipo de muestra, al fijarse en formol, tiene un procesamiento cercano a ser igual que el de una biopsia. Siendo esto importante porque quiere decir que está estandarizado. Este último es el principal problema de los otros tipos de muestras citológicas, a pesar de cómo ya vimos, tener buenos resultados (7).

También tener en cuenta la importancia de los puntos de corte clínicamente relevantes en estas valoraciones. Habiéndose observado resultados comparables a los obtenidos con biopsia sobretodo cuando la expresión de ligando es alta (7).

El uso de rango de valores de expresión (controles externos) pueden ser productivos para validar, en estos casos en los que se ha seguido con el bloque celular el mismo proceso que con una biopsia (7).

En resumen, hay demostraciones de la utilidad de las muestras citológicas (bloques celulares sobre todo) en el estudio de la expresión de PD-L1. Sin embargo, se necesita estandarizar estas tres importantes fases; pre-analítica, analítica y post-analítica. Por tanto, no olvidarse de los retos que se presentan a nivel de cada una de las fases (4,7).

A pesar de lo expuesto, destacar que, una muestra pequeña, puede infraestimar la expresión del ligando (6).

ESTUDIO.

- **Hipótesis y objetivos.**

PD-L1 es una proteína relacionada con el sistema inmune que tiene un papel significativo inhibiendo la respuesta por parte del huésped hacia las células neoplásicas. En el caso del cáncer de pulmón las células expresan esta proteína y es posible su detección por métodos inmunohistoquímicos. Al existir tratamientos específicos frente a esta moléculas y su receptor, se comporta como un biomarcador de respuesta que debe ser cuantificado en el tejido.

El diagnóstico de cáncer de pulmón se lleva a cabo en muestras de biopsia o de citología. En gran cantidad de hospitales el único material celular del que disponemos para dicho diagnóstico es el procedente de ecobroncoscopia (EBUS), es decir una muestra de citología. Sin embargo, la validación de los resultados de PD-L1 sólo se ha realizado y se recomienda sobre muestras histológicas de biopsias. Por tanto, gran cantidad de pacientes no podrían ser sometidos a la determinación del estado de PD-L1 al disponer únicamente de material de EBUS y se verían privados de la posibilidad de recibir tratamientos basados en la inmunoterapia.

Nuestro objetivo es **validar la utilidad de la muestra citológica para la determinación de PD-L1 en muestras de cáncer pulmonar realizadas en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de pacientes que han sido sometidos a inmunoterapia**. Revisaremos todas las pruebas cruzando las realizadas sobre biopsia y sobre citología, buscando pacientes que tengan la prueba realizada en los dos tipos de muestra. Por otro lado estudiaremos la **supervivencia libre de progresión de los pacientes cuya determinación de PD-L1 haya sido realizada en citologías**.

Podemos dividir el trabajo por tanto, en dos subestudios. Por un lado la comparación entre las biopsias y las citologías; y por otro, el seguimiento de los pacientes que hayan sido tratados tras determinación del ligando por técnicas citológicas.

- **Material y métodos.**

- **Biopsia y citología.**

Tenemos dos bases de datos, estas parten del año 2017. Una son los pacientes con cáncer de pulmón a los que se les ha realizado biopsia (557), y otra los pacientes a los que se les ha realizado citología (198) para detectar expresión de PD-L1. Estas bases de datos, como se ha indicado anteriormente son del HUMV.

A partir de aquí, queremos saber a qué pacientes se les ha sometido a ambas técnicas. Cruzamos ambas bases, y vemos que el total de pacientes con biopsia y citología son 12.

Para nuestro estudio nos van a servir tanto los resultados positivos como negativos para la expresión del ligando. Destacar que en los resultados positivos, habrá porcentajes de positividad. De esta manera, veremos la **correlación** entre las dos técnicas, si realmente coinciden o no los resultados y por tanto, si son intercambiables o incluso una superior a la otra.

○ **Supervivencia libre de progresión.**

En esta segunda parte, se ha utilizado tan solo la base de datos de pacientes estudiados mediante la técnica citológica (196), también de pacientes del HUMV. El periodo de tiempo parte del año 2017 como en el otro estudio.

Se ha realizado una revisión para separar a los pacientes en positivos, negativos o no valorables. Siendo la muestra a utilizar los positivos. De estos y separándolos también según su nivel de expresión de ligando, se ha visto si han sido o no tratados y en caso de ser tratados con qué fármaco. A partir de este tratamiento se ha revisado la supervivencia libre de progresión, siendo esta el objetivo de esta parte del estudio.

	No tratados	Tratados
Positivos (117)		
- Altos expresores (49)	35	14
- Bajos expresores (68)	31	37
Negativos (73)	73	-
No valorables (6)	6	-
Muestra total (196)		

En la tabla se expone de forma esquemática y numérica, la muestra que se ha utilizado y como se ha estratificado a los pacientes sometidos a citología. La base de datos consta de 196 pacientes. De estos parte no han sido valorables (6), y los restantes se han dividido según sus resultados positivos o negativos frente a la expresión del ligando de PD-L1 detectado por esta técnica.

Los negativos han sido 73 y los positivos 117. El apartado de resultados estará centrado en los que han sido positivos. Estos son los que nos van a interesar para estudiar como hemos indicado, concretamente los que sí han sido tratados. El objetivo es estudiar la supervivencia tras el tratamiento, se ha obtenido una muestra de 51 pacientes, siendo 14 altos expresores de ligando y 37 bajos expresores.

- **Resultados y discusión.**

- **Biopsia – citología.**

Los resultados al cruzar la base de datos de pacientes sometidos a biopsia y a citología para detectar la expresión y sus porcentajes de PD-L1 en sus células tumorales, han sido el siguiente; (teniendo en cuenta que la muestra resultante para el estudio han sido 12 pacientes).

- **7** pacientes **no concordancia** biopsia – citología.
- **5** pacientes **concordancia** biopsia – citología.
 - 1 negativo en ambas la expresión de PD-L1.
 - 4 positivos.
 - 4 coincidencia exacta (positividad del 20%, 60%, 80% y altos expresores (90%-70%)).

Se exponen de manera sintética estos resultados en la tabla siguiente.

Concordancia	Nº pacientes (12)	%expresión biopsia	%expresión citología
NO (7)	4	1%	(-)
	1	30%	(-)
	1	40%	(-)
	1	60%	<1%
SÍ (5)	1	(-)	(-)
	1	60%	60%
	1	80%	80%
	1	20%	20%
	1	90%	70%

Los resultados muestran que **las biopsias y las citologías coinciden en un 41´66% de los casos y en el 58´33% no**, teniendo en cuenta los puntos de corte anteriores. Dentro de los coincidentes, el 100% va a tener un resultado exactamente coincidente. Esto es debido a que el único caso que el porcentaje no es igual, es considerado igualmente coincidente por ser altos expresores ambos resultados.

A continuación, de modo ilustrativo vemos unas muestras citológicas en las que vemos la expresión de PD-L1.

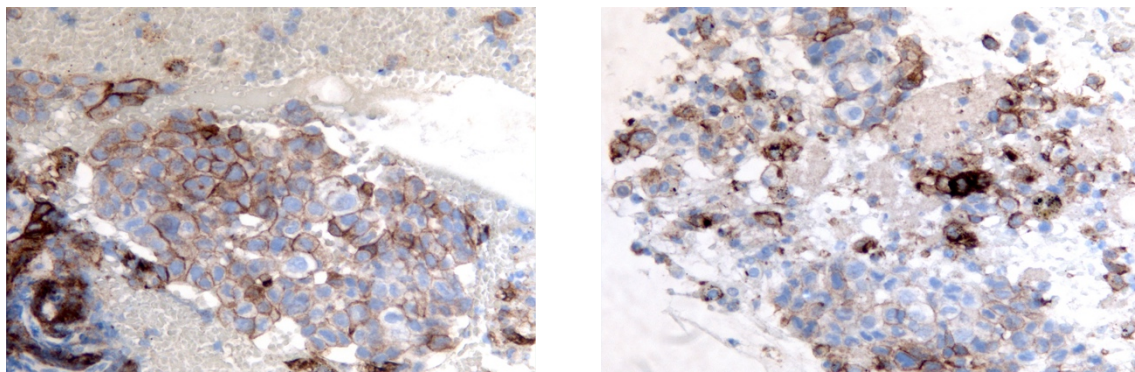


Figura 6. Muestras citológicas de pacientes con cáncer de pulmón en las que se muestra la expresión de PD-L1.

Lo primero y más importante de esta parte del estudio es que, partiendo de la muestra que se ha tenido para realizarle, no se puede dar este por válido por ser muy pequeña. Tan solo 12 pacientes no son representativos para poder validar nuestra hipótesis o llegar a una conclusión válida.

Teniendo eso en cuenta, fijándose en la tabla se puede ver como no se confirmaría la hipótesis, ya que el porcentaje de no coincidentes es mayor al de coincidentes.

El primer grupo, no coinciden. Detectando la biopsia la expresión de PD-L1 y la citología no, siendo negativo en los 7 casos. En cuanto al segundo grupo, como punto positivo respecto a la hipótesis inicial, es que la coincidencia es exacta en el 100% de los casos positivos.

A pesar y recalando lo dicho anteriormente, en esta parte del estudio **no se puede validar la hipótesis ni llegar a una conclusión válida**. Aunque con la pequeña muestra, se vean en el grupo de positivos resultados que puedan favorecerla, se necesitaría una muestra mayor para poder validar. A esto hay que añadirle que el mayor porcentaje de no concordancia se da en casos con muy baja expresión de PD-L1 en la biopsia (del 1%) con lo que la baja celularidad examinada en el caso de las citologías podría ser causa de falsos negativos.

Además, por último, no se ha confirmado que la fecha de realización de los test fuese similar. Es decir, que no se realizasen nuevas tomas de biopsia o citología tras el tratamiento.

○ **Supervivencia libre de progresión.**

En la revisión de la base de datos de los pacientes sometidos a la técnica citológica constando esta de 196 pacientes, los resultados han sido los siguientes y podemos ver una representación gráfica en la figura 7;

- **117 positivos** para expresión de PD-L1.
 - **72 alta expresión.**
 - **45 baja expresión.**

- **73 negativos** para expresión de PD-L1.
- **6 no valorables.**

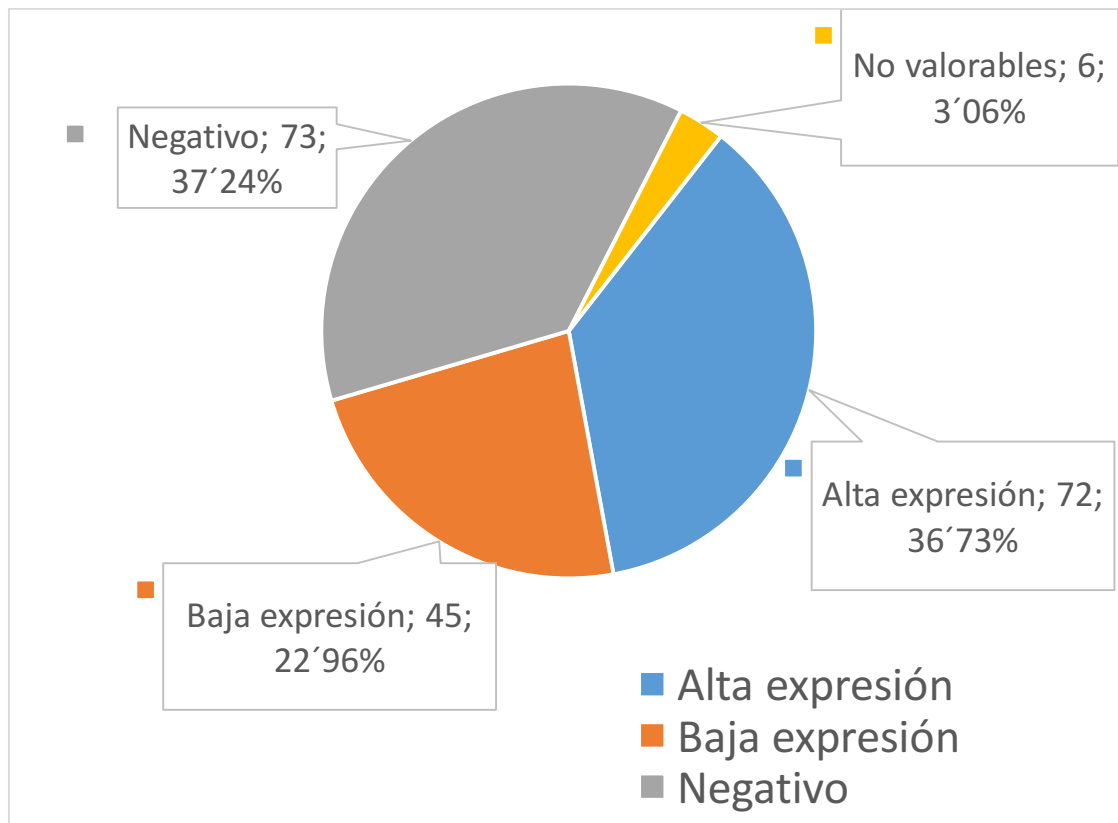


Figura 7. Gráfico en el que se representan los resultados de los pacientes con CPCNP consiguiendo mínimo de 1 año diagnosticados por citología.

Como se ha indicado anteriormente, nuestros resultados se obtienen de los pacientes positivos, siendo la muestra de 117, independientemente de si son altos o bajos expresores.

En cuanto al estadio que ha sido tratado en estos pacientes, tanto los de alta como los de baja expresión han comenzado la terapia con un **estadio avanzado**.

En el caso de los *altos expresores*:

- 1 no estratificado.
- 3 IIIA.
- 5 IIIB.
- 28 IV.

Y en el de los *bajos expresores*:

- 3 no estadificados.
- 2 IIIA.
- 3 IIIB.
- 2 IIIC.
- 4 IV.

Promedio PFS en pacientes tratados positivos altos expresores.	
Fármaco	Media PFS (meses)
Nivolumab	10
Pembrolizumab	15'1
Durvalumab	17'25
Atezolizumab	27

Promedio PFS en pacientes tratados positivos bajos expresores.	
Fármaco	Media PFS (meses)
Nivolumab	4
Pembrolizumab	14
Durvalumab	14,66
Atezolizumab	15,1

De manera sintética, estos han sido los resultados en cuanto a la supervivencia libre de progresión se refiere, obtenidos al tratar a los pacientes positivos PD-L1 para citología. Tanto en pacientes con alta expresión, como con baja expresión, los fármacos usados han sido los mismos.

El fármaco utilizado por excelencia en los altos expresores es el Pembrolizumab. 30 pacientes frente a los 4, 2 y 1 del Durvalumab, Nivolumab y Atezolizumab, respectivamente.

En los bajos expresores el más usado es el Durvalumab. 6 pacientes frente a los 3, 3 y 2 del Pembrolizumab, Atezolizumab y Nivolumab.

Los pacientes que presentan una alta expresión de PD-L1 en sus células tumorales presentan también más respuesta a los fármacos dirigidos contra el como se observa en los resultados. La supervivencia libre de progresión es mayor en estos.

Además en cuanto al fármaco utilizado el que mayor supervivencia presenta es el Atezolizumab, seguido del Durvalumab. Habiendo una diferencia mucho más acusada entre ellos en los que son altos expresores. A pesar de ello, no podemos concluir nada válido, ya que solo se ha visto en 1 paciente.

En base a lo que se acaba de exponer y empezando por los estadios de los pacientes de la muestra, vemos como confirmando lo presentado en el marco teórico del trabajo, esta terapia tiene como principal diana a pacientes con cáncer ya avanzado, siendo el mínimo estadio visto en los pacientes el IIIA. Además la mayoría de ellos se encuentra ya en estadio IV.

Por otra parte, se ve la importancia de la expresión de PD-1 en las células a la hora de tratar al paciente con esta terapia dirigida. Afirmación que quedaría validada al ver que la supervivencia libre de progresión es mayor en todos los fármacos para los pacientes con alta expresión del ligando.

En cuanto a cada fármaco por separado, los resultados con mayor validez son los del pembrolizumab en pacientes con alta expresión, ya que fueron 30 esos pacientes. Mientras que con los otros fármacos se encuentran en un rango de 1 a 6 pacientes.

- **Conclusión.**

- **Biopsia – citología.**

En esta parte del estudio **no han sido obtenidos resultados concluyentes**. La muestra de 12 pacientes ha eliminado la validez necesaria para sacar conclusiones.

Es **necesaria una muestra mucho mayor** para llegar a una conclusión sobre la hipótesis inicial de la intercambiabilidad o incluso superioridad de una técnica sobre otra.

- **Supervivencia libre de progresión.**

La terapia con fármacos dirigidos al ligando o al propio PD-1, ha demostrado en este estudio ser más efectiva cuanto mayor es la expresión del ligando detectado por citología. Por tanto, parece existir una **relación directa entre expresión del ligando sobre muestra citológica y efectividad del fármaco.**

Además de eso, con la revisión de la base de datos, se puede concluir que es una **terapia dirigida especialmente a pacientes con cáncer de pulmón avanzado y que puede ser aplicada con éxito en pacientes que únicamente cuentan con muestra citológica para el diagnóstico.**

CONCLUSIONES.

- La **inmunoterapia** es una de las grandes herramientas a día de hoy para el **tratamiento de esta enfermedad**. Tiene distintas líneas de actuación, siendo la de los **anticuerpos monoclonales** en la que está centrada el trabajo.
- La **expresión** de un determinado ligando (**PD-L1**) en las células tumorales, ha demostrado ser muy importante como **biomarcador tumoral** para desarrollar un **tratamiento específico**.
- Actualmente la **detección** de expresión de este ligando está **validada por medio de biopsias**. A pesar de ello, los resultados obtenidos por medio de **técnicas citológicas** han sido buenos y **prometedores**, sin llegar a ser concluyentes.
- La muestra obtenida de cruzar las **bases de datos del HUMV** de pacientes sometidos a biopsias y a citologías no ha sido concluyente por ser muy reducida. Los resultados **no son válidos** y se **necesitaría un mayor número de pacientes**.
- Se ha visto una **relación directa** entre el nivel de **expresión de ligando** obtenido en muestras citológicas **y la efectividad del fármaco** dirigido contra este en el estudio realizado con pacientes del HUMV.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Society AC. Tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico [Internet]. cancer.org. 2019. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/tratamiento-no-microcitico/inmunoterapia.html>
2. Inmunoterapia contra el cáncer [Internet]. MedlinePlus. 2020. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000903.htm>
3. Tejerina Gonzalez E. Estudio de la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en las células tumorales y en las células inmunes asociadas al tumor en el carcinoma de células pequeñas de pulmón. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina; 2017.
4. Gómez Román J. ¿ Cómo podemos implementar los nuevos biomarcadores en inmunoterapia? [Internet]. 2016. Available from: https://www.seap.es/documents/10157/1432467/Gomez+Roman_SEAP.pdf
5. Sound-Tsao M, M.Kerr K, Dacic S, Yatabe Y, R.Hirsch F, editors. IASLC ATLAS OF PD-L1 IMMUNOHISTOCHEMISTRY TESTING IN LUNG CANCER. RxPress; 2017.
6. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. J Thorac Oncol [Internet]. 2020;15(4):499–519. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.107>
7. Lozano MD, Granados R, Rojo F, López-Ríos F, Conde E. CITO-DETECT. 2021.
8. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, et al. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. Mol Cancer. 2018;17(1):1–14.
9. RocheDiagnosticsUSA. Tumor Microenvironment and PD-L1 biomarker [Internet]. 2018. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=tdsISK9HLp8>
10. Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. Int J Clin Oncol. 2016;21(3):462–73.
11. Qué es la inmunoterapia [Internet]. Cancer.Net. 2020. Available from: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atención-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/inmunoterapia/qué-es-la-inmunoterapia>
12. RocheDiagnosticsUSA. PD-L1 Expression on Immune and Tumor Cells [Internet]. 2018. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=s2a_x1o5UEA

13. Fernandez-Bussy S, Pires Y, Labarca G, R.Vial M. Expresión de PD-L1 en muestras de cáncer pulmonar no microcítico obtenidas por EBUS-TBNA [Internet]. Archbronconeumol.org. 2017. Available from: <https://www.archbronconeumol.org/es-expresion-pd-l1-muestras-cancer-pulmonar-articulo-S0300289617303976>
14. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*. 2017;8(57):97671–82.
15. Zhang M, Li G, Wang Y, Zhao S, Haihong P, Zhao H, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: A meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10925-7>
16. C. Santini F, D. Hellmann M. PD-1/PD-L1 axis in lung cancer. *PubMed Cent*. 2019;1–12.
17. Sui H, Ma N, Wang Y, Li H, Liu X, Su Y, et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for non-small-cell lung cancer: Toward personalized medicine and combination strategies. *J Immunol Res*. 2018;2018:1–17.
18. Kim JM, Chen DS. Immune escape to PD-L1/PD-1 blockade: Seven steps to success (or failure). *Ann Oncol* [Internet]. 2016;27(8):1492–504. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdw217>
19. Prueba de PD-L1 (inmunoterapia) [Internet]. MedlinePlus. 2020. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/prueba-de-pd-l1-inmunoterapia/>
20. No Title [Internet]. Available from: <https://www.eurekalert.org/multimedia/pub/232175.php>
21. Sunshine J, M.Taube J. PD-1/PD-L1 Inhibitors. *PubMed Cent*. 2016;1–14.
22. McLaughlin J, Han G, A. Schalper K, Carvajal-Hausdorf D, Pelakanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC). *PubMed Cent*. 2017;1–15.
23. Informa P intelligence. Webinar - PD-1/PD-L1 Inhibitors: The First Wave of Immuno-Oncology [Internet]. 2017. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=furOPdyMDjU>
24. Gosney JR, Boothman AM, Ratcliffe M, Kerr KM. Cytology for PD-L1 testing: A systematic review. *Lung Cancer*. 2020;141(January):101–6.
25. Koomen BM, van der Starre-Gaal J, Vonk JM, von der Thüsen JH, van der Meij JJC, Monkhurst K, et al. Formalin fixation for optimal concordance of programmed death-ligand 1 immunostaining between cytologic and histologic specimens from patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Cytopathol*. 2021;129(4):304–17.

26. Legorburu NV. Evaluación e interpretación de la técnica inmunohistoquímica PD-L1 en el cáncer de pulmón: Correlación entre muestras citológicas y piezas quirúrgicas. [Internet]. 2018. Available from: <https://www.academia.cat/files/425-13549-DOCUMENT/Vega6711.04.2018.pdf>
27. Ancevski Hunter K, A. Socinski M, C. Villaruz L. PD-L1 Testing in Guiding Patient Selection for PD-1/PD-L1 Inhibitor Therapy in Lung Cancer. PubMed Cent. 2019;1–16.
28. Thunnissen E, de Langen AJ, Smit EF. PD-L1 IHC in NSCLC with a global and methodological perspective. Lung Cancer [Internet]. 2017;113(August):102–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.09.010>
29. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. J Thorac Oncol. 2017;12(2):208–22.
30. Mukhopadhyay S. How to intepret a PD-L1 immunostain [Internet]. 2019. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=pFMn8o6rECM>
31. Heymann JJ, Bulman WA, Swinarski D, Pagan CA, Crapanzano JP, Haghighi M, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung carcinoma: Comparison among cytology, small biopsy, and surgical resection specimens. Cancer Cytopathol. 2017;125(12):896–907.
32. Russell-Goldman E, Kravets S, Dahlberg SE, Sholl LM, Vivero M. Cytologic-histologic correlation of programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung carcinomas. Cancer Cytopathol. 2018;126(4):253–63.
33. Stoy SP, Rosen L, Mueller J, Murgu S. Programmed death-ligand 1 testing of lung cancer cytology specimens obtained with bronchoscopy. Cancer Cytopathol. 2018;126(2):122–8.