



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Medicina

**Estudio inmunohistoquímico de PD-L1 y del  
microambiente tumoral en una cohorte de carcinomas  
de pulmón de célula no pequeña. Correlación con  
factores pronósticos y expresión génica**

María Isabel Esteban Rodríguez

**Directores**

Dr. Javier de Castro Carpeño

Dr. Fernando López-Ríos

Madrid, 2019

El trabajo presentado a continuación ha sido parcialmente financiado por el fondo de investigación sanitaria PI12/0463 (IP Javier de Castro), PI15/00186 (IP Inmaculada Ibáñez), PI17/01001 y iLUNG-CM, B2017/BMD-3884 (IP Fernando López-Ríos) y el estudio multicéntrico con cod. HULP PI-2443 (IP Isabel Esteban).

*A Ana Belén y Víctor*

## AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a todas las personas que me han ayudado en el desarrollo del proyecto.

Muy especialmente al personal del laboratorio de anatomía patológica de La Paz, que han realizado las técnicas (Raquel y Roberto) y al personal del Hospital de San Chinarro (Laboratorio de Dianas Terapéuticas) que me han dado todas las facilidades para el uso de su tecnología (Marta Alonso), al laboratorio de Rosario Perona que realizaron los arrays; y a las personas que me han ayudado y me han explicado tanto y con tanta comprensión, paciencia y amabilidad; y sin los que hubiera tirado la toalla definitivamente:

A Carlos Rodríguez Antolín (bioinformático del grupo de terapias experimentales y biomarcadores en cáncer del IdiPAZ) por darme todo su apoyo y su tiempo, con la interpretación y valoración de los genes, además de mucho ánimo.

A Rosario Madero del servicio de estadística del HULP por atenderme y explicarme con paciencia los análisis estadísticos y por la ilusión que me contagiaba con los resultados.

A Rocío Rosas, (FIR e investigadora del grupo de terapias experimentales y biomarcadores en cáncer del IdiPAZ), que me ayudó con la ardua tarea de revisar las historias clínicas.

A Elena Ruiz por valorar entresacando de su tiempo todas las muestras conmigo.

A Alejandra Caminoa por compartir su experiencia, apoyarme y aconsejarme.

A mi jefe David, porque me apoyó, animó y me dio todas las facilidades desde el primer momento.

A mis “resis” que han aguantado mis reuniones, ausencias y se han adaptado a mis horarios, además de contagiarme de entusiasmo y curiosidad.

A mis amigas y compañeras que me ayudan en el día a día, son mi pañuelo de lágrimas y me hacen reír: Elenita, Rima, Laura, Belén...

A mis “otros” compañeros, por darme siempre todas las facilidades para poder adaptar trabajo y vida: Puri, Antonio y Belén.

A mis directores de tesis Javier y Fernando por proponerme el tema y por su orientación y empuje.

Y a mi familia por aguantar mi mal humor y mi falta de atención tantas horas y días, en especial a mi hija Ana Belén que con sus besos y abrazos me carga de energía para seguir adelante.

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INDICE</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>17</b> |
| 1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA.....  | 19        |
| 1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....   | 20        |
| 1.3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2015. ....   | 21        |
| 1.4. ESTADIFICACIÓN (TNM).....   | 24        |
| 1.5. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA .....  | 26        |
| 1.6. TEST MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN DE TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS<br>(BIOMARCADORES).....  | 28        |
| 1.7. MICROAMBIENTE INMUNE E INMUNOTERAPIA. ....  | 29        |
| <b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....  | <b>39</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>43</b> |
| 3.1. Selección de los casos .....  | 43        |
| 3.2. Estudio anatomopatológico.....  | 43        |
| 3.2.1. Estudio macroscópico.....   | 43        |
| 3.2.2. Estudio microscópico1.....  | 43        |
| 3.2.3. Estudio de biomarcadores de inmunoterapia (expresión proteica de PD-L1 y TILs).....   | 45        |
| 3.3. Estudio de arrays de genoma completo (arrays de CodeLink) .....   | 49        |
| 3.4. Recogida de datos clínicos (TNM, Estadíaje, Tratamientos (Qx, QT, RT).....  | 50        |
| 3.5. Estudio estadístico .....   | 51        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....   | <b>55</b> |
| 4.1. Estudio clínico-patológico de una cohorte de carcinoma de célula no pequeña de pulmón<br>en pacientes sometidos a cirugía (con piezas quirúrgicas)..... | 55        |
| 4.1.1. Análisis descriptivo .....  | 55        |
| 4.1.2. Estudio del valor pronóstico de las variables histológicas y clínicas: .....  | 63        |
| 4.2. Estudio de la expresión proteica de PD-L1 en CPNCP quirúrgicos. ....  | 64        |
| 4.2.1. Análisis descriptivo. ....  | 64        |
| 4.2.2. Correlación entre los diferentes anticuerpos (clones) de PD-L1 intraobservador.....   | 68        |
| 4.2.3. Correlación interobservador con ambos clones (22C3 y 28-8).....   | 69        |
| 4.2.4. Correlación entre la expresión proteica de PD-L1 con las variables clínico-patológicas....  | 70        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.2.5. Estudio del valor pronóstico de la expresión proteica de PD-L1. ....   | 77         |
| 4.3. Estudio del microambiente inmune tumoral (TILs) en CPNCP quirúrgicos. ....   | 78         |
| 4.3.1. Análisis descriptivo. ....   | 78         |
| 4.3.2. Estudio del valor pronóstico de los TILs. ....   | 82         |
| 4.4. Correlación de la expresión de PD-L1 con el contexto inmune (linfocitos T CD8). ....   | 82         |
| 4.5. Correlación de la expresión de PD-L1 en TC con el contexto molecular (estudiado mediante microarrays de expresión génica): ....  | 84         |
| 4.6. Caracterización molecular de los CPNCP quirúrgicos, mediante análisis de niveles de expresión génica con microarrays. Estudio del valor pronóstico añadido a las variables ya conocidas (clínico-patológicas, de expresión de PD-L1 y CD8). .... | 86         |
| <b>5. DISCUSIÓN</b> .....   | <b>95</b>  |
| 5.1. Variables histológicas y clínicas .....  | 95         |
| 5.2. Expresión proteica de PD-L1 .....  | 96         |
| 5.3. Estudio del microambiente inmune tumoral:.....   | 104        |
| 5.4. Concordancia entre expresión de PD-L1 y microambiente inmune. ....   | 107        |
| 5.5. Contexto molecular y su concordancia con la expresión de PD-L1 y el microambiente inmune. ....   | 108        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b> .....  | <b>115</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>119</b> |
| <b>APÉNDICE Y ANEXOS</b> .....  | <b>137</b> |
| Índice de figuras.....  | 137        |
| Índice de tablas.....   | 139        |
| Anexo 1. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica .....  | 141        |
| Anexo 2. Tabla completa de datos de la cohorte.....   | 142        |

## JUSTIFICACIÓN

La inmunoterapia es un tratamiento recientemente incorporado en oncología para múltiples tumores entre ellos el carcinoma de pulmón. Para muchos autores supone un cambio paradigmático en el tratamiento de estos pacientes, en los que se observan buenas respuestas con efectos secundarios menores que los tratamientos convencionales. Usados en monoterapia o en combinación con otros tratamientos hay múltiples ensayos clínicos en marcha. No obstante, no todos los pacientes responden y en algunos casos puede haber respuestas hiperprogresoras de la enfermedad. Por estas razones es importante la mejor selección de los pacientes. De aquí nuestro interés en realizar este estudio valorando la expresión de PD-L1 (*programmed death ligand 1*) con distintos clones en un estudio propio y homogéneo; así como del microambiente tumoral mediante linfocitos T CD8. Además, nos parece interesante intentar encontrar una firma génica asociada a la expresión de PD-L1, por el interés que tiene combinar la inmunoterapia con las terapias dirigidas.

.

## RESUMEN

Hemos estudiado en una cohorte de 53 pacientes quirúrgicos con cáncer de pulmón de célula no pequeña (con igual proporción de adenocarcinomas y carcinomas escamosos) con un largo periodo de seguimiento (más de 10 años), distintos biomarcadores asociados a inmunoterapia. Por un lado, hemos estudiado la expresión proteica de PD-L1 con dos clones distintos (22C3 y 28-8), valorando la correlación entre ambos y la correlación entre distintos observadores; y por otro, un elemento del microambiente, los linfocitos T CD8+, estudiando la cantidad, densidad y localización en los distintos compartimentos (intraepitelial, estroma peritumoral y estroma intratumoral) valorados usando un algoritmo digital automatizado de cuantificación (VENTANA iScan HT). Por último, hemos valorado el perfil de expresión génica de los tumores, mediante arrays de ARN buscando una potencial firma génica asociada a la expresión de PD-L1. Hemos analizado el potencial valor pronóstico de todos ellos de forma independiente y combinados

En nuestra serie, en consonancia con lo descrito en la literatura, encontramos una buena correlación entre los dos clones estudiados tanto en la valoración de la célula tumoral como inmune. La concordancia entre patólogos para ambos clones también es buena en la valoración de la celularidad tumoral, pero no en la valoración de célula inmune.

Hemos visto una prevalencia semejante a la descrita en la literatura en nuestra cohorte, con lo que pensamos que las muestras de archivo antiguas (como es nuestro caso de más de 10 años), con los controles adecuados y seleccionando el material bien conservado, pueden ser un material adecuado para la determinación de este biomarcador.

En nuestra serie, encontramos relación entre la expresión de PD-L1 en celularidad inmune y la densidad y el número de linfocitos CD8 en estroma peritumoral e intraepitelial. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna relación entre la expresión de PD-L1 en célula tumoral y los linfocitos CD8 en ninguno de los compartimentos estudiados. Sí vemos correlación entre la expresión de PD-L1 en célula tumoral y el grado de diferenciación G3, el estadio N y el hábito tabáquico.

Sólo encontramos valor pronóstico, en el subtipo histológico y grado de diferenciación (adenocarcinoma sin componente micropapilar y G1-2 tienen mejor pronóstico).

En el estudio de expresión génica encontramos un perfil molecular diferencial en los pacientes con estadio I y II y en los de grado no G3; con la expresión de PD-L1  $\geq 1\%$  y  $\geq 50\%$  (alta expresión).



Encontramos un modelo pronóstico con una buena capacidad predictiva de SLE (índice de Harrell de 0,76) con la combinación de AD no micropapilar, PD-L1 en células inmunes con el clon 28-8 y la expresión de ARN de *EGFR* y *PD-L1*; que mejora añadiendo los genes *CDH7*, *WDR26*, *UBXN11* o *ADIPOR1* (con índices de Harrell entre 0,81-0,82); y en SG (índice de Harrell de 0,68) con la combinación de hábito tabáquico, porcentaje de GL positivos, densidad de CD8 en estroma intratumoral y peritumoral; que mejora añadiendo la expresión de los genes *NGDN*, *MYOD1*, *ADCYAP1R1* o *CCL17*(con índices de Harrell entre 0,73-0,76).

## ABSTRACT

We studied different biomarkers associated with immunotherapy in a 53 surgical patients' cohort with non-small cell lung cancer (with same adenocarcinoma and squamous cell carcinoma ratio) during a long-term following period (more than 10 years). On one hand, we studied PD-L1 protein expression with two different clones (22C3 and 28-8), assessing consistency between them and between different observers. On the other hand, we studied CD8 + T lymphocytes in the microenvironment, their amount, density and location in different compartments (intraepithelial, peritumoral stroma and intratumoral stroma) using an automated digital quantification algorithm (VENTANA iScan HT). Finally, we have studied the gene profile of these tumors, with an ARN matrix (code link) searching a potential genetic signature associated with PD-L1 expression. We have studied their prognostic and predictive value independently and combined.

In our series, according to what is described in the literature, we found a good consistency between the two clones studied in the evaluation of both tumor and immune cells. Pathologists consistency for both clones is also good in tumor cellularity assessment, but not in the immune cell.

We have seen a similar prevalence in our cohort to the previously described in the literature, so we think that archive samples (as is our case with more than 10 years old), with appropriate controls and selecting well-preserved material, may be a suitable material for this biomarker determination.

In our series we have seen a relationship between PD-L1 expression in immune cells and the density and absolute value of CD8 lymphocytes in peritumoral and intraepithelial stroma. However, we have not found any relationship between PD-L1 expression in tumor cells and CD8 lymphocytes in any of the compartments studied. We have found a correlation between PD-L1 expression in tumor cells and the G3 differentiation degree, the N stage and the smoking habit.

Regarding the prognostic value, we did not find statistically significant prognostic differences in PD-L1 expression or in the amount or location of CD8. However, we have found a correlation with the histological subtype (adenocarcinoma without micropapillary component better prognosis) and the differentiation degree (worse prognosis in G3 as defined in the present study).

In the gene expression analysis, we found a differential molecular profile in positive PD-L1 patients ( $\geq 1\%$ ) and high expression ( $\geq 50\%$ ), if stratified by histological grade, not G3 or stage I-II.

Regarding the predictive value, we found a model with a good predictive capacity of SLE (Harrell index of 0.76) with the combination of non-micropapilar AD, PD-L1 in immune cells with clone 28-8 and expression of EGFR and PD-L1 RNAs, which improves by adding genes CDH7, WDR26, UBXN11 or ADIPOR1 (Harrell index between 0.81-0.82); and in SG (Harrell index of 0.68) with the combination of smoking habit, percentage of positive GL, CD8 density in intratumoral and peritumoral stroma, which improves by adding the expression of the NGDN, MYOD1, ADCYAP1R1 or CCL17 genes (Harrell index between 0.73-0.76).

## **ABREVIATURAS**

## LISTADO DE ABREVIATURAS

### A

**Ac:** anticuerpo

**AD:** adenocarcinoma

**Admon:** administrado

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**Ag:** antígeno

**ALK:** *Anaplastic Lymphoma Kinase*

**ARN:** ácido ribonucleico

### B

**BRAF:** *B-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

### C

**CA:** carcinoma

**CAR-T:** receptores de antígeno quimérico en las células T (se componen de fragmentos o dominios de anticuerpos sintéticos). Es un tipo de transferencia celular adoptiva

**CCI:** Coeficiente de Correlación Intraclase.

**CE:** carcinoma epidermoide

**Cga:** campos de gran aumento

**CMH:** complejo mayor de histocompatibilidad

**CNCG:** Carcinoma neuroendocrino de célula grande

**CP:** cáncer de pulmón

**CPCP:** carcinoma de pulmón de células pequeñas

**CPA:** células presentadoras de antígenos

**CPNCP:** carcinoma de pulmón no célula pequeña

**CTLA-4:** *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*

### D

**DRIVERS:** referido a mutaciones, es la principal o conductora

### E

**EIF4E-binding protein:** *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Binding Protein 1*

(Proteína de unión a EIF4E)

**EIT:** estroma intratumoral.

**EMA:** *European Medicines Agency* (Agencia Europea del Medicamento)

**EPT:** estroma peritumoral

**ESTs:** *expressed sequence tags* (marcador de secuencia expresada)

## F

**FDA:** *US Food and Drug Administration* (Agencia Americana del Medicamento)

**FDR:** *False discovery rate* (Tasa de descubrimientos falsos)

**FISH:** *Fluorescence in situ hybridization* (Hibridación fluorescente *in situ*)

## G

**G1:** grado histológico 1 (bien diferenciado)

**G2:** grado histológico 2 (moderadamente diferenciado)

**G3:** grado histológico 1 (pobrementemente diferenciado)

## H

**HE:** Hematoxilina-eosina

**HER2:** Receptor tirosina quinasa erb-b2

**HR:** *Hazard Ratios*

## I

**IASLC:** *International Association for the Study of Lung Cancer*

**IC:** *immune cell* (célula inmune).

**IdC:** Intervalo de confianza

**IE:** intraepitelial

**IHQ:** inmunohistoquímica

## L

**1L, 2L, 3L:** primera, segunda y terceras líneas de tratamiento

**LSD:** lóbulo superior derecho

**LID:** lóbulo inferior derecho

**LIMMA:** *Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data* (paquete para el análisis de datos de expresión génica que surgen de la tecnología de micromatriz o ARN-Seq)

**LM:** lóbulo medio

**LSI:** lóbulo superior izquierdo

**LII:** lóbulo inferior izquierdo

## **M**

**MET:** proteína tirosina quinasa MET.

**MTS:** metástasis

## **N**

**NTRK:** *Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor* (receptor de tirosina quinasa neurotrófico)

## **O**

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

## **P**

**PAS-D:** ácido periódico de Schiff-diastasa

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

**PD-1:** *Programmed Death-1*

**PD-L1:** *Programmed Death-Ligand-1*

**PD-L2:** *programmed Death-Ligand 2*

**PS:** *Performance Status* (escala del estado físico general del paciente)

## **Q**

**QT:** quimioterapia

## **R**

**R0:** resección quirúrgica con margen libre de afectación tumoral

**RET:** *Rearranged during transfection gene*

**ROS1:** oncogén C-ROS

**RT:** radioterapia

## **S**

**SI:** sistema inmune

**SBRT:** *Stereotactic radiotherapy*

**SG:** supervivencia global

**SLE:** supervivencia libre de enfermedad

**SLEE:** supervivencia libre de enfermedad específica

**SI:** sistema inmune

## T

**TC:** célula tumoral

**TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*.

**TCR:** *T cell receptor* (receptor de linfocitos T)

**TGFb:** *Transforming Growth Factor beta* (Factor de crecimiento transformante beta)

**TILs:** *Tumor-Infiltrating Lymphocytes* (linfocitos intratumorales)

**TKI:** *Tyrosine Kinase Inhibitor* (inhibidores de tirosina quinasa)

**TNM:** sistema de estadificación de las neoplasias desarrollado por la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*)

**TMA:** *Tissue microarrays* (microarrays de tejido)

**TPS:** *Tumor proportional scoring*

## V

**VEGFR:** *Vascular Endothelial Growth Factor* (Factor de crecimiento vascular endotelial)

## W

**WES:** *Whole Exome Sequencing* (secuenciación completa del exoma)



# **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de morbi-mortalidad por cáncer en el mundo (**Siegel et al. 2012**) y es el responsable de tantas muertes como las que ocasionan en conjunto los tumores más frecuentes como son los de colon, mama y próstata (**Brustugun et al. 2014**).

Este tipo de cáncer se divide en dos grandes grupos: el carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP). Éste último grupo corresponde al 85% aproximadamente de todos los cánceres de pulmón, con una supervivencia global del 15% (**Goldstraw et al. 2011**).

Dentro del grupo de CPNCP, el más frecuente es el subtipo adenocarcinoma (AD), representando más del 40%. El 32% del CPNCP corresponde a carcinomas escamosos (CE) y un 2% a carcinoma de célula grande. En el 4% de casos restante, no se puede especificar el subtipo (**Travis et al. 2015**). La mayoría de estas neoplasias se diagnostican en estadio avanzado con una supervivencia a los 5 años inferior al 5%.

Los nuevos tratamientos desarrollados en los últimos años con fármacos diana frente a *EGFR* y *ALK* para pacientes con tumores que presentan estas alteraciones moleculares (“*driver*”), han mejorado la supervivencia (**Rosell and Karachaliou 2016**). Sin embargo, en enfermedad metastásica, la mayoría de CPNCP que no presentan mutaciones tratables (85%), el tratamiento estándar ha sido la quimioterapia con medianas de supervivencia libre de progresión de 5-6 meses y una supervivencia global de alrededor de 12-15 meses, por lo que se necesitan estrategias terapéuticas más eficaces.

En este sentido, la inmunoterapia ha emergido como la gran opción terapéutica para el CPNCP (**Ferrara et al. 2018**). La inmunidad mediada por las células T es determinante en el control de enfermedades como el cáncer, pero las células tumorales son capaces de utilizar mecanismos de regulación de la respuesta inmunológica, los denominados puntos de control o “*checkpoints*”, para escapar de su control y así producir la progresión de la enfermedad tumoral. De este modo, ha sido clave el descubrimiento de las alteraciones en la interacción de PD-1 (*Programmed Death-1*) y sus ligandos PD-L1 (*Programmed Death-Ligand 1*) y PD-L2 (*Programmed Death-Ligand 2*), como uno de los mecanismos más relevantes de evasión inmunológica utilizado por las células tumorales. Estas últimas generan un microambiente mediante la liberación de factores solubles y moléculas de superficie que inhiben la función de las células T (**Pardoll 2012**). En los últimos años, se han desarrollado anticuerpos que son capaces de revertir el bloqueo de estos ligandos involucrados en los “*checkpoint*” (que son vías inhibitorias cruciales para el mantenimiento de la auto-tolerancia) y así activar nuevamente la respuesta de

los linfocitos T frente a la celularidad tumoral, actuando como tratamientos antitumorales muy eficaces

Estos ligandos inhibidores y receptores que regulan las funciones efectoras de células T suelen sobreexpresarse en células tumorales o en el microambiente tumoral. De hecho, se ha demostrado una elevada expresión de PD-L1 en muchos tumores y su correlación con el pronóstico. De este modo, la inmunoterapia es una estrategia de tratamiento reciente con buenos resultados en diferentes tipos de tumores como el melanoma, CPNCP, tumores renales y el cáncer de mama triple negativo (**Ott et al. 2013, Festino et al. 2016, Ma et al. 2016, Mansour et al. 2017**). Actualmente la investigación se ha dirigido a intentar identificar biomarcadores predictivos de respuesta a estas nuevas terapias con resultados no totalmente satisfactorios hasta la fecha.

El biomarcador actualmente más usado es la proteína PD-L1. Se valora mediante inmunohistoquímica y hay actualmente varios anticuerpos comerciales (clones que usan distintas plataformas de tinción) para seleccionar a los pacientes a tratar con distintos fármacos de inmunoterapia. Los “score” o niveles de expresión usados son distintos según los ensayos clínicos. Por otro lado, las aprobaciones de la FDA para los fármacos, están asociadas en unos casos a la determinación de PD-L1 de forma acompañante o sólo complementaria (**Tsao, 2017 a**). En las siguientes tablas se resumen los distintos tipos de clones comerciales empleados y su asociación con los diferentes fármacos actualmente aprobados o en estudio (**Tabla 1**), así como los principales ensayos clínicos en relación con dichos fármacos (**Tabla 2**).

**Tabla 1.** Relación entre los clones de PD-L1, el fármaco asociado, punto de corte de positividad y designación de aprobación FDA. (Adaptado de Tsao M. ASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer).

| Clon de Ac de PD-L1 | Plataforma de tinción     | Fármaco de inmunoterapia            | Puntos de corte de expresión de PD-L1 en ensayos clínicos | Designación FDA |
|---------------------|---------------------------|-------------------------------------|---|-----------------|
| 28-8                | Dako Link 48              | Nivolumab (Bristol-Myers Squibb)    | ≥ 1%, ≥ 5%  | Complementario  |
| 22C3                | Dako Link 48              | Pembrolizumab (Merck)               | ≥ 1%, ≥ 50%   | Acompañante     |
| SP 142              | Ventana Benchmark o Ultra | Atezolizumab (Genentech/Roche)      | TC: ≥ 1%, ≥ 5%, ≥50%<br>IC: ≥ 1%, ≥ 5%, ≥10% (por área)   | Complementario  |
| SP 263              | Ventana Benchmark o Ultra | Durvalumab (AstraZeneca/ Medimmune) | ≥ 25%   | Sin designación |
| 73-10               | Dako Link 48              | Avelumab (Pfizer/Merck Serono)      | ≥ 1%, ≥ 50%, ≥80%   | En desarrollo   |

**Tabla 2.** Principales ensayos en monoterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón, aprobados o en vías de la aprobación FDA. (Adaptado de Herzberg B, 2017; Gong, 2018 y Caminoa-Lizarralde 2018).

| Fármaco                            | Estudio   | Población y nº pacientes (N)   | Randomización                                  | Principales hallazgos  | Indicaciones/Aprobaciones FDA/EMA   |
|------------------------------------|---|--|--|--|---|
| ANTI PD1<br><b>pembrolizumab</b>   | <b>KEYNOTE-010</b><br>Fase II/III<br><b>(Herbst et al. 2016)</b>  | CPNCP metastásicos previamente tratados con PD-L1 $\geq$ 1% TC y EGFR y ALK, negativos<br><br>(n = 1034) | Pembrolizumab (2mg/Kg o 10 mg/Kg) vs Docetaxel | Mejor SG comparado con docetaxel: con 2mg/kg (SG 10,2 vs 8,5 m; HR, 0,71) y con 10 mg/kg (SG 12,7 vs 8,5 m; HR, 0,61)<br>Eficacia del TTº mayor en pacientes con expresión PD-L1 $\geq$ 50%. | FDA y EMA en CPNCP MTS, previamente tratados, con PD-L1 $\geq$ 1% ( $\geq$ 2L)  |
| ANTI PD1<br><b>pembrolizumab</b>   | <b>KEYNOTE-024</b><br>Fase III<br><b>(Reck et al. 2016)</b>       | CPNCP metastásicos, no tratados con PD-L1 $\geq$ 50% TC y EGFR y ALK, negativos<br><br>(n=305)           | Pembrolizumab (200mg) vs QT basada en platino  | Mejor SLE comparado con QT (SLE 10.3 vs. 6.0 m; HR 0.50)<br><br>Mejor SG a 6 m comparado con QT (SG 80,2 vs. 72,4 m ; HR 0.60)   | FDA y EMA en CPNCP MTS, no tratados previamente, con PD-L1 $\geq$ 50% y EGFR, ALK negativos ( $\geq$ 1L)  |
| ANTI PD1<br><b>nivolumab</b>       | <b>CheckMate-017</b><br>Fase III<br><b>(Brahmer et al. 2015)</b>  | CPNCP escamoso metastásico previamente tratados. Independiente de PD-L1.<br><br>(n = 272)                | Nivolumab 3 mg/kg vs Docetaxel                 | Mejor SLE comparado con QT (SLE 3,5 vs 2,8 m; HR 0,62).<br><br>Mejor SG comparado con QT (SG 9.2 vs. 6.0 m; HR 0.59)<br>Expresión de PD-L1 no asociado con valor predictivo ni pronóstico.   | FDA y EMA aprobado en CPNCP escamosos MTS, previamente tratados, independiente de expresión de PD-L1. ( $\geq$ 2L)                              |
| ANTI PD1<br><b>nivolumab</b>       | <b>CheckMate-057</b><br>Fase III<br><b>(Borghaei et al. 2015)</b> | CPNCP no escamoso metastásico previamente tratados. Independiente de PD-L1.<br><br>(n = 582)             | Nivolumab 3 mg/kg vs Docetaxel                 | Mejor SG comparado con QT (SG 12.2 vs. 9.4 M; HR 0.73)   | FDA y EMA aprobado en CPNCP no escamosos MTS o localmente avanzado, previamente tratados con recomendación de positividad de PD-L1 ( $\geq$ 2L) |
| ANTI PD- L1<br><b>atezolizumab</b> | <b>OAK</b><br>Fase III<br><b>(Rittmeyer et al. 2017)</b>          | CPNCP metastásico previamente tratados.<br><br>(n = 1225)  | Atezolizumab 1200 mg vs Docetaxel              | Mejor SG comparado con QT (SG 13,8 vs. 9.6 M; HR 0.73).  | FDA aprobado en CPNCP no escamosos MTS, previamente tratados ( $\geq$ 2L)   |

Otra parte importante en la respuesta inmune en relación al CPNCP son los linfocitos T intratumorales (TIL). Se encuentran en la literatura distintos artículos que reflejan su importancia, como se desarrollará más adelante en el epígrafe 1.7.

### 1.1. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer en el mundo (**Siegel et al. 2015**) y refleja la epidemiología de la causa más habitual con la que se relaciona que es el tabaco (**Lozano et al. 2012**).

Hay otros factores de riesgo: diferentes agentes ocupacionales como asbesto, arsénico, berilio, etc. (usados en la industria metalúrgica, química o de la construcción, entre otras), radiación, etc. También hay relación con un compuesto natural como el radón que puede estar implicado en el desarrollo de esta neoplasia en ciertas regiones.

El cáncer de pulmón en pacientes que nunca han fumado es mucho menos frecuente y, en éstos, los posibles agentes causales son la radiación, agentes ocupacionales o ser fumadores pasivos.

La mayoría de los tumores de pulmón son carcinomas. Los tipos más frecuentes son el adenocarcinoma, carcinoma epidermoide, carcinoma de células grande y el carcinoma de célula pequeña. El tabaco está asociado con todos los tipos, pero en mayor medida con el tipo escamoso y el de célula pequeña. La proporción de estos tipos ha sido variable a lo largo de los años. El carcinoma escamoso ha pasado del 32% al 20% de todos los cánceres de pulmón, el adenocarcinoma de menos del 30% a > 40% (en 2006-2010), el carcinoma de célula pequeña del 17 al 13% y el carcinoma de célula grande del 8 al 2%. En el caso del adenocarcinoma, esta variación está relacionada, en parte, por la distinta composición de los cigarrillos (con el uso de filtros y mayores niveles de nitrosaminas que en modelos animales se ha visto que produce adenocarcinoma) y, por otro lado, con los nuevos criterios para el diagnóstico de adenocarcinoma y carcinoma escamoso que incluyen datos inmunohistoquímicos, que permiten subtipificar mejor. Parte de los casos que antes se incluían en el término de carcinoma de célula grande y ahora se consideran adenocarcinomas (**Travis et al. 2015**).

### 1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los síntomas del paciente con cáncer de pulmón (CP) son muy variados. Los más frecuentes son dificultad respiratoria, tos, dolor torácico, ronquera y hemoptisis. Si la enfermedad está diseminada dolor abdominal u óseo y síndrome constitucional con pérdida de peso.

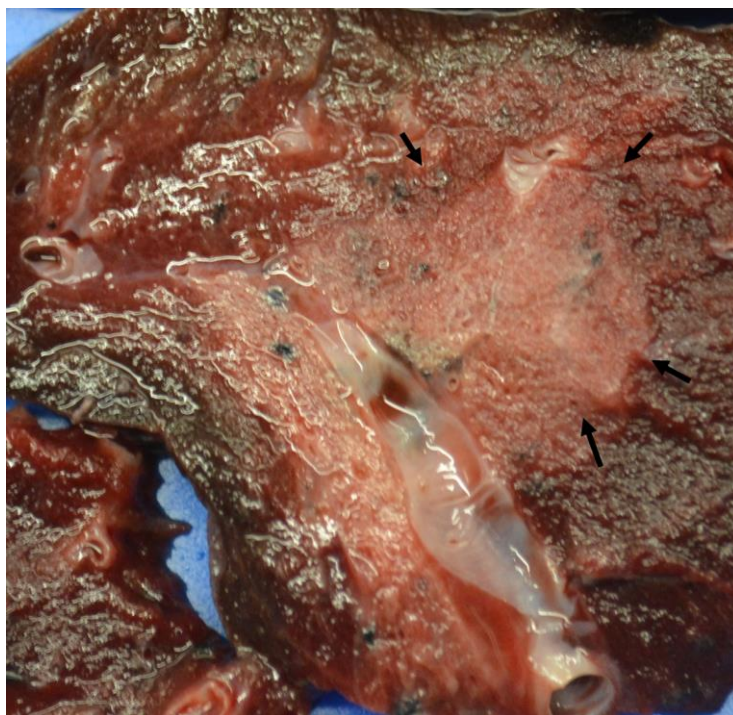
La mayoría de CP se presentan como enfermedad localmente avanzada o metastásica. Un 23% de los casos tienen ganglios linfáticos locales afectados y más de 60% metástasis a distancia. Sólo en un 16% de los casos la enfermedad está localizada en el pulmón. Son frecuentes las metástasis cerebrales al diagnóstico; y en el curso de la enfermedad se dan hasta en más de un 20% de los pacientes.

Otro grupo de síntomas frecuentes en el cáncer de pulmón, son los síndromes paraneoplásicos relacionados con la producción de autoanticuerpos producidos por el tumor como dermatomiositis/polimiositis, osteoartropatía hipertrófica, encefalopatía, neuropatía periférica,

síndromes miasténicos, mielitis transversa y leucoencefalopatía multifocal progresiva; y los endocrinológicos, como hipercalcemia, hiponatremia, S. Cushing, S. carcinoide, etc, secundarios a la síntesis anormal de hormonas. Con la excepción de la hipercalcemia y la osteopatía hipertrófica, son más frecuentes en el tipo de célula pequeña y más infrecuentes en adenocarcinomas que en los otros subtipos (Travis *et al.* 2015).

Desde el punto de vista radiológico, el CP se presenta como una masa o nódulo más frecuentemente periférico y en lóbulos superiores, aunque puede desarrollarse en cualquier área del parénquima pulmonar y el tracto respiratorio.

En general, los carcinomas escamosos suelen ser más centrales y con frecuencia sufrir cavitación, mientras que los de célula pequeña suelen tener una localización hilar. Los adenocarcinomas, sin embargo, suelen estar situados en las áreas periféricas y pueden presentarse como consolidación o imagen en vidrio deslustrado (en patrones histológicos lepidicos) (Figura 1). También pueden dar imagen de consolidación los CE si se asocian con neumonía obstructiva.



**Figura 1.** Imagen macroscópica de un adenocarcinoma con áreas de vidrio deslustrado (señalado con flechas el límite del tumor con el parénquima normal).

### 1.3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA OMS 2015.

La primera clasificación histológica de los tumores pulmonares realizada por la OMS es de 1981. Desde entonces se realizan revisiones periódicas con modificaciones. La última

actualización es del año 2015 (Travis *et al.* 2015). En ella los principales cambios son los referidos al adenocarcinoma, en el que se incorporan los términos adenocarcinoma *in situ*, mínimamente invasivo e invasivo con distintos patrones de crecimiento, entre ellos el patrón lepidico (antiguo adenocarcinoma bronquioloalveolar). Por otro lado, se define qué terminología usar en muestras citológicas o biopsias pequeñas (Figura 2) en las que se usa la integración de datos moleculares (perfil de expresión inmunohistoquímico) e histoquímicos para definir los tumores como de perfil adenocarcinoma o escamoso. Así, si el tumor tiene expresión de TTF-1 y/o napsina A o con técnica de PAS-D se identifican al menos 5 células tumorales positivas cada 2 campos de gran aumento (cga), se clasificará como adenocarcinoma (AD). Si el tumor tiene expresión difusa de p40, p63 y/o CK5/6, se clasifica como carcinoma escamoso (CE). Se reserva el término carcinoma de célula grande sólo a las resecciones quirúrgicas en las que el estudio completo del tumor descarte áreas de diferenciación escamosa o de adenocarcinoma, o un inmunofenotipo compatible con uno de ellos (requiere por tanto el estudio IHQ porque es un diagnóstico de exclusión).

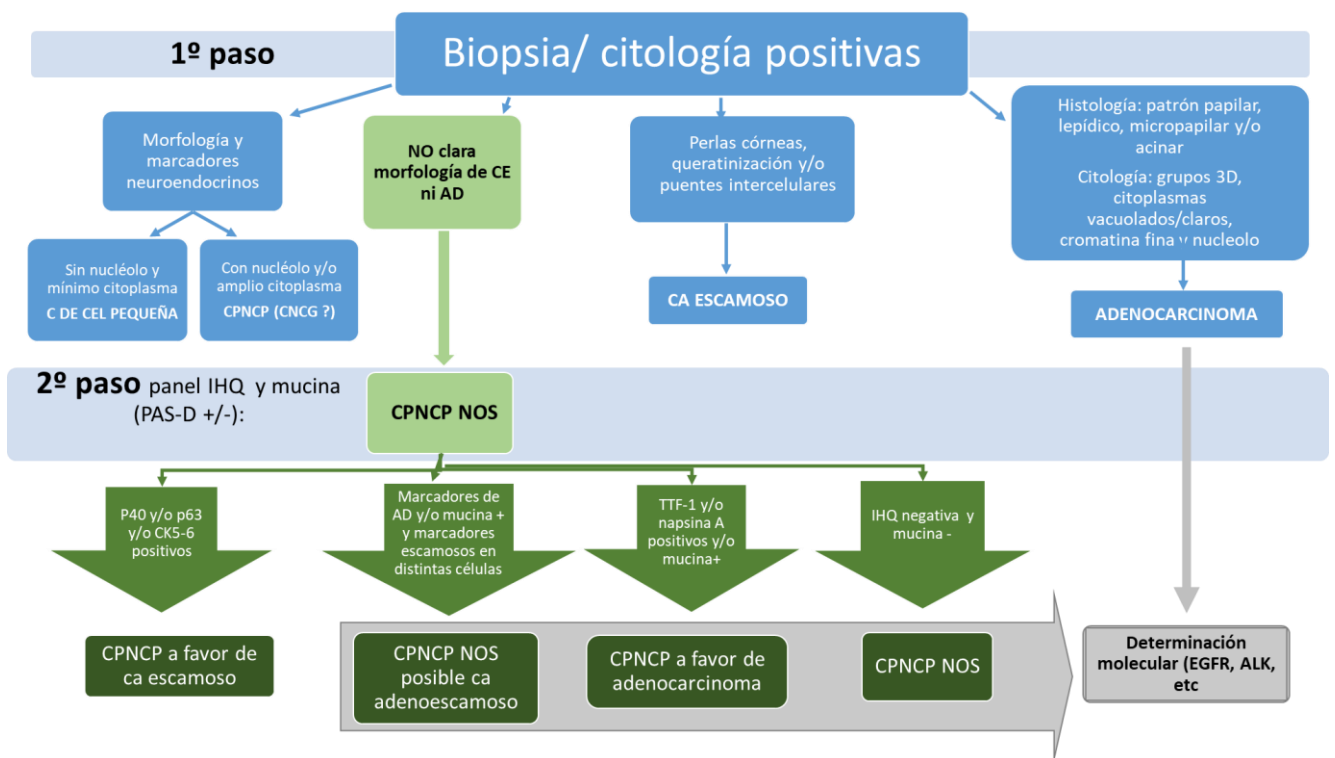


Figura 2. Algoritmo diagnóstico en biopsias pequeñas/citologías (Modificado de Travis, 2011).

En la clasificación de la OMS se incluyen todos los tipos tumorales tanto los epiteliales (más frecuentes) como mesenquimales, linfohistiocíticos, de origen ectópico o metastásicos. Los tumores más frecuentes son los tumores epiteliales primarios y dentro de ellos actualmente el más

frecuente es el adenocarcinoma (más de un 40%), seguido del carcinoma escamoso que representa el 20%. Estos dos subtipos junto a otros más infrecuentes (carcinoma adenoescamoso y tumores de tipo glándula salivar) se engloban en el término genérico de carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPNCP). El otro gran grupo, el carcinoma de célula pequeña (tumor neuroendocrino de alto grado) supone un 13% de casos de CP.

Como ya hemos comentado, el otro gran cambio en la clasificación de la WHO 2015 con respecto a 2004, es el diagnóstico y subtipos de adenocarcinoma. Se incorpora el término lepidico sustituyendo al bronquiolo alveolar de la clasificación previa. Es un subtipo que corresponde a un tumor con crecimiento no infiltrativo, constituido por una proliferación de células mucosas o no mucosas, atípicas, que sustituyen a los neumocitos y que se extienden a través de los septos alveolares, sin alterar la arquitectura normal del parénquima. Si el tumor es solitario, sin necrosis, mide  $\leq 3$  cm y únicamente está constituido por este subtipo, sin que exista invasión de la pleura visceral, invasión linfocascular, infiltración perineural ni diseminación a través de los espacios aéreos, se clasifica como adenocarcinoma in situ (nueva entidad). Si cumpliendo todos los requisitos previamente descritos, se encuentra un mínimo componente invasivo (ya sea por infiltración del estroma o porque exista otro tipo de patrón de crecimiento papilar, acinar, micropapilar o sólido) que mida  $\leq 0,5$  cm, se denominará adenocarcinoma mínimamente invasivo.

- Lesiones preinvasivas**
- ✓ Hiperplasia atípica.
  - ✓ Adenocarcinoma in situ ( $\leq 3$ cm antes bronquioloalveolar)
    - No mucinoso.
    - Mucinoso
    - Mixtos mucinosos y no mucinoso.
- Adenocarcinoma mínimamente invasivo** ( $\leq 3$ cm predominantemente lepidico, con  $\leq 5$  mm invasión)
- ✓ No mucinoso.
  - ✓ Mucinoso
  - ✓ Mixtos mucinosos y no mucinoso.
- Adenocarcinoma invasivo.**
- ✓ Predominantemente lepidico (antes bronquioloalveolar no mucinoso con  $>5$  mm invasión)
  - ✓ Predominantemente acinar.
  - ✓ Predominantemente papilar.
  - ✓ Predominantemente micropapilar
  - ✓ Predominantemente sólido con producción de mucina.
- Variantes de adenocarcinoma invasivo**
- ✓ Adenocarcinoma mucinoso invasivo (antes bronquioloalveolar mucinoso).
  - ✓ Coloide.
  - ✓ Fetal (bajo y alto grado)

**Figura 3.** Términos diagnósticos de adenocarcinoma en clasificación WHO 2015 (Adaptado de Travis, 2011).



Si se realiza una resección completa del adenocarcinoma *in situ*, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) es del 100% y en el caso de adenocarcinoma mínimamente invasivo no es esperable la recurrencia. En el caso que el componente invasivo sea mayor de 0,5 cm se usará el término adenocarcinoma invasivo y se indicará el patrón de crecimiento predominante y los porcentajes del resto de patrones que incluya el tumor (sustituyendo al término mixto). Por ejemplo, un adenocarcinoma de patrón predominante lepidico (80%), con áreas de patrón acinar (10%) y micropapilar (10%). En la **Figura 3** se refleja un resumen de la terminología usada para el adenocarcinoma en la clasificación WHO 2015.

Dentro del carcinoma epidermoide se eliminan los subtipos papilar, célula clara y célula pequeña, se mantiene el subtipo basaloide y se añaden los términos carcinoma epidermoide queratinizante y no queratinizante. Éste último (CE no queratinizante) requiere estudio IHQ para su diagnóstico (expresión difusa de algún marcador escamoso como p40, p63 o CK5/6 y negatividad de TTF-1). Los CE queratinizantes se dividirán en grados, bien diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) y pobremente diferenciado (G3), según la proporción de queratinización. El subtipo basaloide se caracteriza por ser un tumor pobremente diferenciado (células con escaso citoplasma con núcleo sin o con pequeño nucléolo, sin amoldamiento), de arquitectura lobular, con empalizada periférica y estroma hialino prominente. Además, puede tener un componente queratinizante que debe ser menor del 50% para incluirlo en esta categoría (basaloide).

### 1.4. ESTADIFICACIÓN (TNM)

La estadificación TNM (sistema internacional que determina la extensión del tumor) en cáncer de pulmón ha sido modificada recientemente. El sistema actualmente vigente es la 8ª edición TNM (desarrollada por el Comité de Factores de Estadificación y Pronóstico de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón) (**Travis et al. 2016, Nicholson et al. 2018**).

Como se incluye en la nueva clasificación histológica la categoría de adenocarcinoma *in situ* y mínimamente invasiva, se añaden al estadio T (tamaño tumoral) pTis y pT1mi (respectivamente). El estadio pT1 se subdivide según el tamaño del tumor (teniendo en cuenta únicamente el tamaño del componente invasivo) en pT1a ( $\leq 1$  cm), pT1b ( $> 1 - \leq 2$  cm) y pT1c ( $> 2 - \leq 3$  cm). (**Figura 4**)

| Estadio Patológico                                  |                                 |            |                         |  |  |                                     |
|---|---------------------------------|------------|-------------------------|--|--|-------------------------------------|
| Componente invasivo                                 | 0 cm                            | 0 cm       | ≤ 0,5 cm                | 0,6-1,0 cm   | 1,1-2,0 cm   | 2,1-3,0 cm                          |
| Tamaño total del tumor (incluyendo patrón lepidico) | Normalmente ≤ 0,5 cm            | ≤ 3,0 cm   | ≤ 3,0 cm                | 0,6-3,0 cm   | 1,1-3,0 cm   | 2,1-3,0 cm                          |
| Histología  | Hiperplasia adenomatosa atípica | AD In Situ | AD Mínimamente Invasivo | AD predominantemente lepidico o invasivo con componente lepidico | AD Invasivo con componente lepidico o predominantemente lepidico | AD Invasivo con componente lepidico |
| Estadio patológico                                  |                                 | pTis       | pTmi                    | pT1a   | pT1b   | pT1c                                |

Figura 4. Esquema de estadio pT para adenocarcinomas hasta pT1. (Adaptado de Travis 2016).

Igualmente, el estadio pT2 se subdivide en pT2a (>3 y ≤4 cm) y pT2b (>4 y ≤ 5 cm). La afectación pleural independientemente del tamaño del tumor cambia el estadio. De forma que los tumores menores de 3 cm, pero con afectación de la pleura visceral pasan a estadio pT2a y los que tienen afectación de la pleura parietal a pT3. El resto de cambios se reflejan en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Estadios pTNM en cáncer de pulmón, 8ª Ed (Nicholson 2018).

**T0:** sin evidencia de tumor primario.  
**Tis:** Carcinoma in situ (AIS) para AD in situ ó Tis (SCIS) para escamosos in situ.  
**T1:** Tumor ≤ 3cm sin invasión más allá del bronquio lobar.  
 T1 mi: AD mínimamente invasivo.  
 T1a: Tumor ≤ 1cm  
 T1b: >1 cm pero ≤ 2 cm.  
 T1c: >2 cm pero ≤ 3 cm.

**T2:** > 3cm pero ≤ 5 cm ó con una de las siguientes características:  
 ✓ afectación bronquio principal  
 ✓ invasión de la pleura visceral (PL1, PL2).  
 ✓ asociación con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar ya sea afectando parte ó la totalidad del pulmón.  
 Con éstas características se clasifican como T2a si son ≤ 4 cm, o no puede determinarse y T2b si son > 4 cm pero ≤ 5 cm .  
 T2a: > 3 cm pero ≤ 4 cm .  
 T2b: > 4 cm pero ≤ 5 cm.

**T3:** > 5 cm pero ≤ 7 cm ó con una de las siguientes características:  
 ✓ invasión directa de una de las siguientes estructuras: pleura parietal (PL3), pared costal (incluyendo tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal  
 ✓ nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo que el primario.

**T4:** > 7 cm ó con invasión de una de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, nervio recurrente, carina, tráquea, esófago, vértebra; ó nódulos tumorales separados en diferente lóbulo ipsilateral al tumor primario.

**N0:** Ganglios negativos.  
**N1:** MTS en ganglios peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales y/o intrapulmonares (Estaciones 10-14).  
**N2:** MTS en ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales (Estaciones 2-9).  
**N3:** MTS en ganglios mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, ipsilaterales o contralaterales escalenos o supraclaviculares.

**M1a:** Nódulos tumorales separados en lóbulo contralateral; nódulos pleurales/pericárdicos ó derrame maligno pleural o pericárdico.  
**M1b:** MTS extratorácica única en un único órgano.  
**M1c:** MTS extratorácicas múltiples en uno o varios órganos.

Por tanto, los estadios también cambian teniendo en cuenta la nueva TNM, quedando como se refleja en la siguiente tabla (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Estadios en cáncer de pulmón, 8ª Ed.

| ESTADIO | T               | N           | M   |
|---------|-----------------|-------------|-----|
| 0       | Tis             | N0          | M0  |
| IA1     | T1mi            | N0          | M0  |
|         | T1a             | N0          | M0  |
| IA2     | T1b             | N0          | M0  |
| IA3     | T1c             | N0          | M0  |
| IB      | T2a             | N0          | M0  |
| IIA     | T2b             | N0          | M0  |
| IIB     | T1 ó T2         | N1          | M0  |
|         | T3              | N0          | M0  |
| IIIA    | T1 ó T2         | N2          | M0  |
|         | T3              | N1          | M0  |
|         | T4              | N0 ó N1     | M0  |
| IIIB    | T1 ó T2         | N3          | M0  |
|         | T3 ó T4         | N2          | M0  |
| IIIC    | T3              | N3          | M0  |
| IVA     | T1, T2, T3 ó T4 | N1, N2 ó N3 | M1a |
|         | T1, T2, T3 ó T4 | N1, N2 ó N3 | M1b |
| IVB     | T1, T2, T3 ó T4 | N1, N2 ó N3 | M1c |

## 1.5. TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA

El tratamiento de CPNCP depende del estadio del tumor y del estado físico del paciente. En general, en estadios iniciales (I-II), el tratamiento de elección es el quirúrgico. Además, la indicación de QT adyuvante basada en cisplatino en los casos con afectación ganglionar se debe considerar, y es controvertida en los tumores con tamaño menor de 4 cm. En casos inoperables y con un tamaño inferior a los 5 cm puede contemplarse como alternativa la radioterapia (RT) estereotáxica (SBRT).

El estadio III es un grupo heterogéneo, que requiere un tratamiento por un equipo multidisciplinar de expertos. En líneas generales, si es un tumor con bordes libres (R0) con N2 incidental se considera dar RT tras QT adyuvante. Si N2 se documenta intraoperatoriamente se dará QT adyuvante +/- RT. Si es un IIIA (N2) resecable, se puede realizar QT neoadyuvante (cisplatino) seguido de cirugía. Si se trata de un IIIA (N2) no resecable (con mucho volumen tumoral (*bulky*) o afectación mediastínica múltiple con buen estado general (PS 0-1), la QT-RT concurrente es el tratamiento de elección (QT basada en cisplatino, siendo etopósido o vinorelbina

la combinación más frecuente con el platino). Si no es posible la concurrencia, la alternativa es inducción con QT seguida de RT definitiva (**Garcia-Campelo et al. 2015, Postmus et al. 2017**).

En el estadio IV o metastásico en pacientes sin mutaciones “*driver*” con buen estado general (PS 0-1), se recomienda una combinación de QT citotóxica según el tipo histológico. En el caso de carcinoma escamoso se darán dos fármacos basados en platino y la combinación se elegirá según la toxicidad y comorbilidades del paciente. En el caso de carcinomas no escamosos (en general adenocarcinoma), se recomienda la combinación de un doble platino (cisplatino-pemetrexed; o si hay contraindicaciones o el paciente es de edad avanzada pemetrexed-carboplatino). También, en el adenocarcinoma se puede añadir en primera línea (1L), si no hay contraindicaciones, un antiangiogénico (bevacizumab) con PS 0-1.

Si hay MTS solitarias se pueden tratar localmente con Qx, RT o SBRT. Tras el fracaso de los tratamientos de 1L, como segunda línea (2L) están indicados docetaxel, erlotinib, o pemetrexed (solo en los no escamosos), aunque también se pueden usar en ciertos casos combinaciones de fármacos o nuevos fármacos en ensayos clínicos.

Además, actualmente se incluyen los tratamientos de inmunoterapia en estadio IV en pacientes sin mutaciones ni traslocaciones, incluso en 1L, como se desarrollará en el epígrafe 1.7.

El grupo de pacientes con mejor respuesta al tratamiento son aquellos (la mayoría de subtipo adenocarcinoma) con mutaciones “*drivers*” sensibilizantes, que tienen tratamientos dianas (la selección de estos pacientes se desarrolla en el epígrafe 1.6).

En estos pacientes está indicado el tratamiento específico en 1L. A pesar de todo, suelen recaer, ya sea porque dejan de responder al tratamiento, en cuyo caso hay fármacos de 2ª ó 3ª generación de rescate, o porque adquieren nuevas mutaciones o traslocaciones. Por esto último, es importante la rebiopsia para la determinación de posibles nuevas mutaciones potencialmente tratables. En el caso de la resistencia a fármacos antitirosín quinasa (anti-TKI), es importa el estudio de nuevo buscando la mutación EGFR T790M para la que hay fármacos de 3ª generación (Osimertinib, AZ9291, Rociletinib, HM61713, EGF 816 o ASP 8273) (**Garcia-Campelo et al. 2015, Novello et al. 2016, Hanna et al. 2017, Bironzo and Di Maio 2018, Ferrara et al. 2018**).

En la siguiente tabla hay un resumen de los principales tratamientos novedosos (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Opciones terapéuticas estándar actuales y novedosas (incluidos ensayos clínicos fases III en rojo y fases I/II en morado) en CPNCP (Adaptado de Ferrara R, 2018).

| SUB GRUPO | CON ALTERACIONES DRIVER   | OTROS   |   | ALTAMENTE SENSIBLES A INMUNOTERAPIA   |
|-----------|---|---|---|---|
|           |   | NO ESCAMOSOS  | ESCAMOSOS   |   |
| 1L        | EGFR: gefitinib, erlotinib, afatinib, icotinib, dacomitinib, osimertinib, poziotinib (si mut en exón 20)  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Platino-CT</li> <li>✓ Pemetrexed</li> <li>✓ Bevacizumab (puede añadirse)</li> <li>✓ Pembrolizumab + platino/pemetrexed (US)</li> <li>✓ Nivolumab + Ipilimumab</li> <li>✓ Nivolumab + Platino-CT</li> </ul>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Platino-CT</li> <li>✓ Necitumumab puede añadirse</li> <li>✓ Nivolumab + Ipililumab</li> <li>✓ Nivolumab + Platino CT</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pembrolizumab si PDL1 ≥ 50% TC</li> <li>✓ Atezolizumab en TC 2/3- IC 2/3</li> <li>✓ Avelumab en PDL1 ≥ 1%</li> <li>✓ Durvalumab en PDL1 ≥ 25%</li> <li>✓ Nivolumab + Ipilimumab</li> <li>✓ Nivolumab + platino CT</li> <li>✓ Pembrolizumab + platino/pemetrexed (en no escamosos)</li> </ul> |
|           | ALK: crizotinib, ceritinib, alectinib, lorlatinib, ensartinib   |   |   |   |
|           | BRAF: dabrafenib + trametinib   |   |   |   |
|           | ROS1: crizotinib, ceritinib, entrectinib  |   |   |   |
|           | MET: crizotinib   |   |   |   |
|           | NTRK: larotrectinib, entrectinib  |   |   |   |
| ≥ 2L      | <ul style="list-style-type: none"> <li>EGFR: osimertinif si T790M+</li> <li>EGFR+/MET+: savolitinib + osimertinib.</li> <li>ALK: ceritinib, alectinib, brigatinib, lorlatinib, ensartinib</li> <li>BRAF: dabrafenib + trametinib</li> <li>RET: vandetanib, LOXO-292</li> <li>HER2: TDM-1</li> <li>ROS1: lorlatinib</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Docetaxel +/- nintedanib</li> <li>Docetaxel +/- ramucirumab</li> <li>Bevacizumab + paclitaxel (en no escamosos si beva no se admón. En 1L)</li> <li>Nivolumab</li> <li>Atezolizumab</li> <li>Avelumab</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Platino CT basado en histología (si pembro en 1L)</li> <li>Pembrolizumab en PDL ≥ 1% (si no se admón. En 1L)</li> <li>Nivolumab</li> <li>Atezolizumab</li> <li>Durvalumab en PDL1 ≥ 25%</li> <li>Avelumab</li> </ul> |   |

■ Estudios fase III     ■ Estudios fase I y II

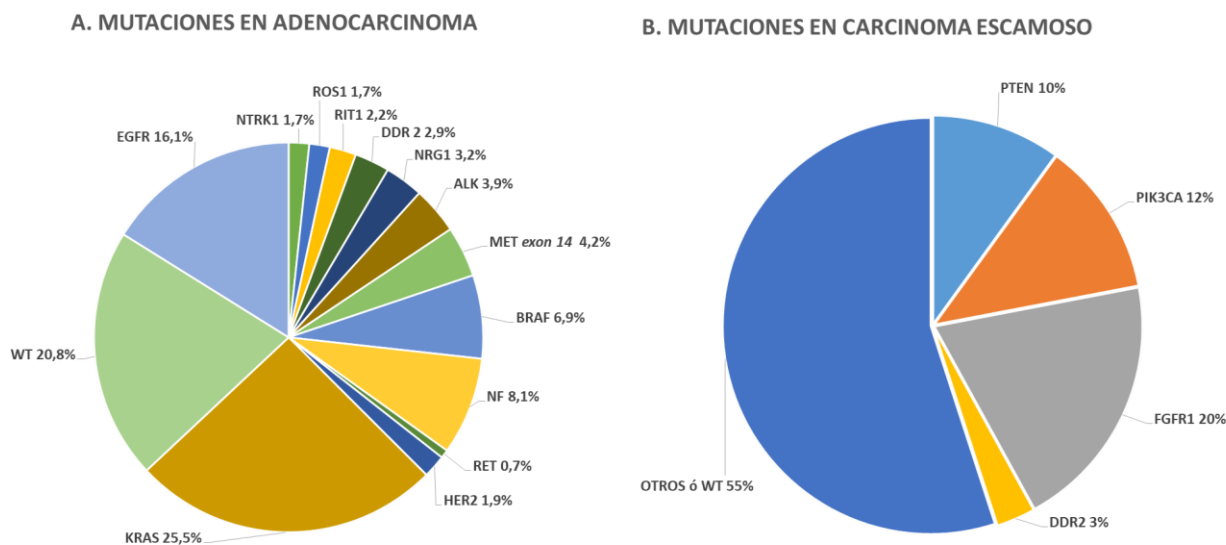
### 1.6. TEST MOLECULARES PARA LA SELECCIÓN DE TRATAMIENTOS ESPECÍFICOS (BIOMARCADORES)

La selección del tratamiento basado en marcadores moleculares predictivos ha modificado sustancialmente el enfoque clínico de los pacientes con un CPNCP y las líneas de investigación de los últimos años.

La respuesta a inhibidores tirosina quinasa (TKIs) en pacientes portadores de mutaciones en el gen *EGFR*, representa uno de los mayores avances terapéuticos en el CPNCP de la última década. En el año 2007, la identificación de la translocación del ALK se sumó al listado de biomarcadores predictivos en dicho subtipo tumoral. Hoy en día, ambas determinaciones se consideran esenciales en la práctica clínica a la hora de decidir las opciones terapéuticas de un paciente con carcinoma de pulmón, siendo además una información relevante en el diseño de ensayos clínicos prospectivos (Conde E 2015). En las guías actuales se incluye también la determinación de *ROS1* (CAP/IASLC/AMP) entre los marcadores a realizar inicialmente en los pacientes con estadio avanzado y diagnóstico de adenocarcinomas o con características clínicas asociadas con más probabilidad de mutaciones/traslocaciones driver oncogénicas (Lindeman et al. 2018). La sociedad americana de oncología clínica define estas características clínicas como pacientes jóvenes de menos de 50 años y con poca o nula exposición al tabaco, recomendando además la determinación de *BRAF* en todos los tumores que tengan un componente de

adenocarcinoma, o sean no célula pequeña no escamosos (**Kalemkerian et al. 2018**). La guía de biomarcadores nacional propone una estrategia similar (**Felip et al. 2015**).

Los pacientes con éstas y otras mutaciones o traslocaciones (como *RET*, *HER2* o *MET*) que tiene tratamiento específico tienen una tasa de respuesta del 80% aproximadamente, frente a una menor respuesta con inmunoterapia (del 50%) en los que tienen alta expresión de PD-L1 (**Lindeman et al. 2018**). Pero en general sólo los adenocarcinomas y en un bajo porcentaje tienen mutaciones específicas (16% *EGFR*, 1-7% *ROS*, 3-9% *ALK*, etc.) (**Rosell et al. 2016**) (**Figura 5**).



**Figura 5.** Esquema de los porcentajes de las mutaciones encontradas en adenocarcinomas de pulmón (A) y carcinoma escamoso (B). (Modificado de Rosell R. 2016).

Sin embargo, aproximadamente la mitad de todos los CPNCP localmente avanzados o metastásicos, tienen expresión de PD-L1 siendo esta expresión alta en un 22% de los casos y, por tanto, potencialmente tratables en primera línea con inmunoterapia (pembrolizumab) (**Dietel M 2018**).

Por tanto, el estudio de biomarcadores para la selección de pacientes para inmunoterapia también es importante y abarca un número más elevado que los portadores de alteraciones “driver”.

### 1.7. MICROAMBIENTE INMUNE E INMUNOTERAPIA.

Actualmente la inmunoterapia, como se ha comentado previamente, constituye un tratamiento en estudio en multitud de tumores sólidos en distintos órganos y distintos tipos histológicos. Hay múltiples ensayos clínicos en melanoma, carcinoma de célula no pequeña de pulmón, carcinoma urotelial de vejiga, carcinoma renal, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma

de ovario, carcinoma de colon con inestabilidad de microsatélites, etc. (**Chen et al. 2012, Ott et al. 2013, Festino et al. 2016, Ma et al. 2016, Mansour et al. 2017, Ramamurthy et al. 2017**).

Algunos autores hablan de un cambio paradigmático en el tratamiento en oncología con la inmunoterapia, ya sea usándola en monoterapia o en combinación con otros tratamientos. Las combinaciones pueden ser con varios fármacos de inmunoterapia (que actúen mediante distintos mecanismos o en distintos puntos de control), o con otros tratamientos de quimioterapia convencional o radioterapia (**Mazzone et al. 2017, Chowdhury et al. 2018, Grenier et al. 2018, Marshall and Djamgoz 2018, Patel and Minn 2018, Wang et al. 2018**).

Hay distintos ensayos que ya han llevado a la aprobación por la FDA y/o EMA distintos fármacos en tumores avanzados en segunda línea (ipilumab en melanoma; nivolumab, pembrolizumab y atezolizumab en CPNCP, atezolizumab en carcinoma de vejiga, etc.), o en primera línea (pembrolizumab en CPNCP en pacientes seleccionados con una expresión de PD-L1 en el tumor de  $\geq 50\%$ ) (**Hargadon et al. 2018, Meyers et al. 2018**).

Por tanto, es imprescindible realizar una revisión sobre el concepto de inmunoterapia y todo el gran desarrollo que ha tenido en los últimos años.

Dentro del término inmunoterapia se incluyen distintos tratamientos que interactúan con el sistema inmune (SI) en el tratamiento frente al cáncer. Se divide en inmunoterapia pasiva (anticuerpos monoclonales antitumorales como trastuzumab o cetuximab o ingeniería de TCR, CAR-T, infusión de TIL) e inmunoterapia activa. Ésta última se subdivide en las que son antígeno dependiente (vacunas) o antígeno independiente (inhibidores de los puntos de control del sistema inmune como anticuerpos anti CTLA-4, anti PD1 y anti PD-L1) (**Tsao et al. 2017**).

Los tumores tienen múltiples mecanismos para desarrollarse y avanzar; y uno de ellos es el bloqueo o evasión del sistema de control inmunitario (**Hanahan and Weinberg 2011**). Usan los mecanismos fisiológicos de defensa y autotolerancia frente a las infecciones o para evitar eventos autoinmunes, y lo bloquean, de manera que éste no reconoce a las células tumorales como extrañas y no las ataca.

El sistema inmune tiene distintos mecanismos de control que incluyen el reconocimiento, presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígenos (CPA), la activación de los linfocitos T y finalmente la destrucción de la célula anómala. Primero se produce el reconocimiento del antígeno por parte de las CPA, que internalizan el antígeno y lo procesan a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) para exponerlo en la membrana celular. Una vez se encuentra el CMH-Ag en la superficie celular, las CPA expresan B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) y migran hacia los ganglios linfáticos. En el ganglio linfático interactúan CPA y linfocito, y

a través de la unión de B7.1 y B7.2 con CD28 (en la membrana del linfocito T), se produce la activación de estas células que migran hacia el tumor. Cuando las células T reconocen el antígeno en el microambiente tumoral, libera enzimas citotóxicas y citocinas para amplificar la respuesta inmune, crear memoria inmunológica y evitar el crecimiento tumoral. Sin embargo, la constante inflamación y activación de la respuesta inmune genera mecanismos de regulación negativos para su control.

Los puntos de control del SI ("*immune checkpoints*") son múltiples. Unos producen un efecto de inhibición de la señal de activación del linfocito T y otros una activación. De manera que también podrían ser múltiples las interacciones con los distintos receptores de las diferentes vías de señal. Usándolas tanto los tumores, para desactivar a los linfocitos T, como por fármacos permitiendo que reconozcan de nuevo al tumor y vuelvan a actuar (**Pardoll 2012**). En base a esto, recientemente se han desarrollado fármacos inhibidores de los puntos de control del sistema inmune (SI). Se basan fundamentalmente en revertir este efecto, haciendo que sea el propio sistema inmune ya desbloqueado el que actúe frente a las células tumorales.

De estas vías o puntos de control los más estudiados hasta la fecha son CTLA-4 y la vía PD-1/PD-L1.

CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) se expresa únicamente en células T y sus ligandos son B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). Regula las etapas precoces de la activación de los linfocitos T en los ganglios linfáticos (**Ribas 2012, McDermott and Atkins 2013**). Compite con mayor afinidad con CD28, y cuando se produce la unión CTLA-4/B7 (CD80 y CD86), se envía una señal negativa que inhibe la activación del linfocito T. Usando este mecanismo se desarrollaron distintos fármacos que bloqueaban la vía y restauraban la inmunidad. Uno de ellos, Ipilimumab, que fue el primero en demostrar una mayor supervivencia en pacientes con melanoma metastásico, frente a los tratamientos convencionales y el primero en conseguir aprobación FDA (2010) (**Pardoll 2012**).

La otra gran vía estudiada es PD-1/PD-L1. PD-1 es un receptor de membrana de la familia CD28 y lo expresan en la superficie células activadas T, B y NK. Sus ligandos son PD-L1 (también llamados B7-H1 o CD274) y PD-L2 (también llamados B7-DC o CD273), miembros de la familia B7 y estos lo expresan CPA activadas, células de parénquima y hematopoyéticas en microambiente inflamatorio, placenta y las células tumorales de algunos tumores (sólidos y hematológicos) mientras que PD-L2 no lo expresa el epitelio ni las células mesenquimales. PD-L2 está implicado en las últimas fases de la respuesta inmune, regulando al linfocito T en los tejidos periféricos. Algunos tumores también usan esta vía para escapar del SI, sobreexpresando PD-L1. Hay dos mecanismos para esta regulación, la resistencia inmune innata y la adaptativa. En la innata los tumores tienen una señalización oncogénica constitutiva que aumenta la expresión

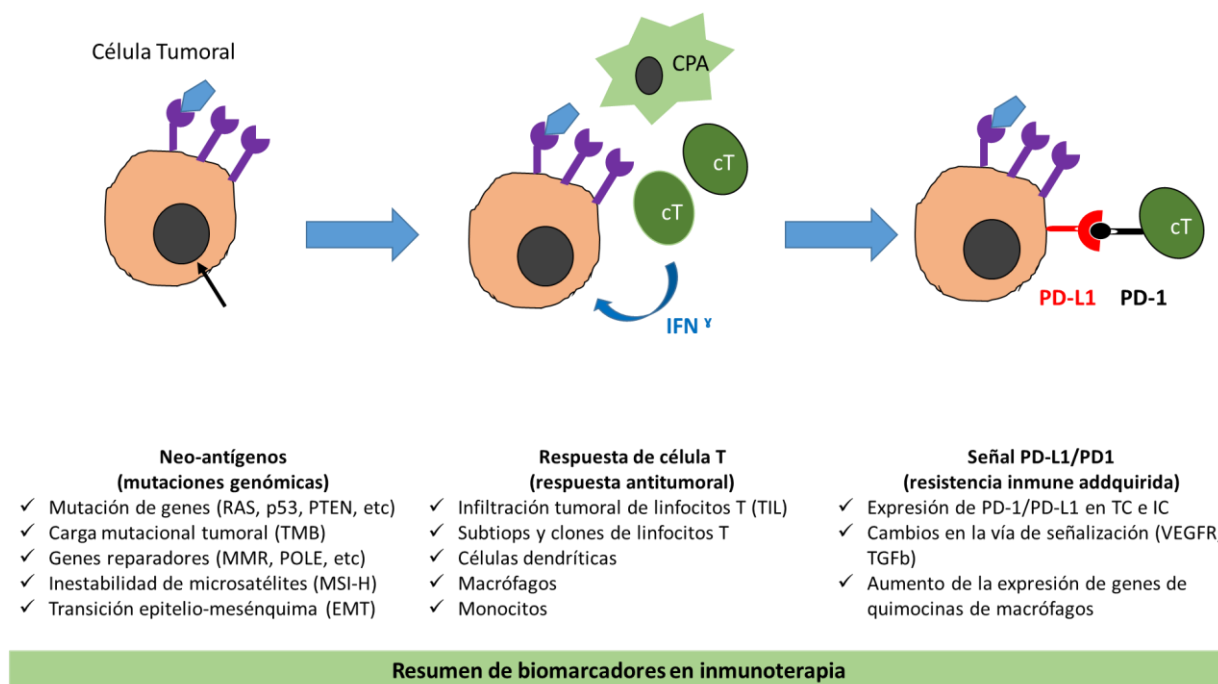


de PD-L1 en las células tumorales independientemente de las señales inflamatorias en el microambiente tumoral y en la resistencia adaptativa, son estas señales inflamatorias activadoras (fundamentalmente en respuesta a interferones, predominantemente IFN $\gamma$ ) las que inducen la expresión de PD-L1 en las TC (**Kim et al. 2005, Lee et al. 2005, Wilke et al. 2011, Pardoll 2012**).

El bloqueo de ésta vía, ya sea mediante anticuerpos monoclonales frente a PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, etc) o frente a PD-L1 (atezolizumab, duvalumab, avelumab, etc) consigue que se restablezca la capacidad inmunológica de los linfocitos T frente a las células tumorales (**Meng et al. 2015, Festino et al. 2016, Ma et al. 2016, Du et al. 2017**), siendo ya uno de los tratamientos incluidos en las guías ESMO y ASCO del tratamiento del CPNCP (**Novello et al. 2016, Hanna et al. 2017, Bironzo et al. 2018**).

Éstos nuevos tratamientos han demostrado en distintos ensayos clínicos una mejor supervivencia frente a QT convencional, pero, a pesar de ello, sólo el 20-30% de pacientes seleccionados responden al tratamiento en 2L y el 50% aproximadamente en 1L (**Lindeman et al. 2018, Lindeman et al. 2018, Lindeman et al. 2018**). Por otro lado, se ha visto que algunos pacientes a pesar de expresar PD-L1 tienen respuestas paradójicas con hiperprogresión de la enfermedad. Por ello se han estudiado distintos biomarcadores predictores de respuesta al tratamiento, que mejoran la selección de los pacientes. La expresión de PD-L1 ha sido valorada en distintos ensayos clínicos (**Borghaei et al. 2015, Brahmer et al. 2015, Garon et al. 2015, Fehrenbacher et al. 2016, Grigg and Rizvi 2016, Herbst et al. 2016, Herbst et al. 2016, Reck et al. 2016, Remon et al. 2016, Buttner et al. 2017**) viendo en todos ellos una mayor respuesta a mayor expresión de PD-L1. En el caso de CE en tratamiento con nivolumab también los de expresión negativa tenían mayor respuesta que con QT convencional (CheckMate 017) (**Brahmer et al. 2015**).

Otros biomarcadores que se han estudiados son: la carga mutacional (una alta carga mutacional se asocia con mejor respuesta al tratamiento) (**Rizvi et al. 2015**), la presencia de linfocitos CD8+ en el margen de invasión del tumor (**Tumeh et al. 2014**), el tabaco (los pacientes fumadores tienen mejor respuesta a tratamiento con pembrolizumab, nivolumab y atezolizumab, probablemente por ser tumores con una mayor carga mutacional) y las mutaciones en la vía de reparación del ADN (inestabilidad de microsatélites en el carcinoma colorrectal) (**Gibney et al. 2016, Sacher and Gandhi 2016, Shien et al. 2016, Topalian et al. 2016, Qin et al. 2018**). En la siguiente figura podemos ver un esquema resumen de los distintos grupos de biomarcadores para la selección de los pacientes para inmunoterapia (**Figura 6**).



**Figura 6.** Figura resumen de los biomarcadores en inmunoterapia (adaptada de Qin et al, 2018).

Actualmente el biomarcador validado y más usado es la expresión de PD-L1 en muestras tumorales (**Shukuya and Carbone 2016**). No obstante, hay distintos problemas que hacen que no sea un marcador ideal (**Bhaijee and Anders 2016, Borczuk and Allen 2016, Kerr and Hirsch 2016, Kerr and Nicolson 2016, Sholl et al. 2016**). Por un lado, hay diferentes anticuerpos (clones) de PD-L1 (al menos cinco) y diferentes plataformas tecnológicas de procesado y tinción para su determinación. Además, los ensayos han usado estos distintos clones dando distintos puntos de corte de positividad y en unos casos valorando solo célula tumoral (TC) o TC y célula inflamatoria (IC) (**Tabla 1**). También se trata de un marcador que puede ser cambiante en función del microambiente, por lo que podría variar su expresión con el tiempo o tras tratamientos de QT y/o RT. Incluso, puede tener una tinción heterogénea dentro del mismo tumor (heterogeneidad temporal y espacial). Posiblemente, por todos estos factores se han descrito un 6 % y un 30 % de discordancia entre determinaciones dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral) y entre el tumor primario y las metástasis (heterogeneidad intertumoral), respectivamente (**Phillips et al. 2015, Caminoa-Lizarralde 2018**).

Para intentar solucionar uno de los problemas planteados (el de distintos clones), que significaría tener que usar múltiples anticuerpos en función del fármaco que se decidiera como tratamiento, se han realizado diferentes estudios de armonización para ver si los clones son equivalentes. Es decir, se tiñen las mismas células en localización y porcentaje, lo que supondría

que cada laboratorio podría usar uno de ellos con independencia del fármaco elegido. Ésta es una tabla resumen de los principales estudios realizados en este sentido. (**Tabla 6**).

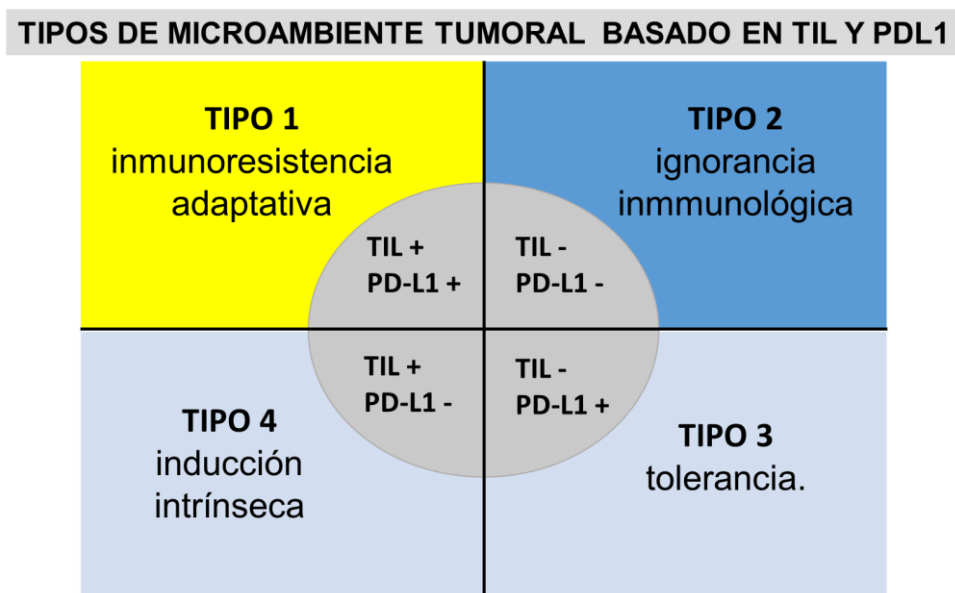
**Tabla 6.** Diferentes estudios de armonización de los distintos clones de PD-L1.

| Autores (estudio)                                     | Casos (N)/tipo de muestra   | Clones a estudio                  | Nº de patólogos | Concordancia en TC   | Concordancia en IC   |
|---|---|-----------------------------------|-----------------|--|--|
| <b>Hirsch (Blueprint fase 1) (Hirsch et al. 2017)</b> | 39/piezas q.  | 22C3, 28-8, SP263 y SP142         | 3               | Semejante 22C3/28-8/SP263 y menor expresión con SP142  | Tinciones más variables con todos los clones.                        |
| <b>Scheel (Ring) (Scheel et al. 2016)</b>             | 15/piezas q   | 22C3, 28-8, SP263 y SP142         | 9               | Semejante 22C3, 28-8, menor SP142 y mayor SP263/ concordancia (K= 0,75 y 0,72)                         | Baja concordancia (K<0,2)  |
| <b>Rimm (Yale) (Rimm et al. 2017)</b>                 | 90/piezas q   | 22C3, 28-8 y SP 142               | 13              | Semejante 22C3, 28-8, menor SP142/ concordancia (K= 0,86)  | Baja concordancia (K =0,1)   |
| <b>Adam (Adam et al. 2018)</b>                        | 41/piezas q   | 22C3, 28-8 y SP 263               | 7               | Alta concordancia (K≥ 0,75)  | En general acuerdo en el % (75-90%)                                  |
| <b>Ratcliffe (Ratcliffe et al. 2017)</b>              | 500   | 22C3, 28-8 y SP 263               | 1               | Concordancia en el % en el 91-97%.   | No recogido  |
| <b>Tsao (Blueprint fase 2) (Tsao et al. 2018)</b>     | 81/21 pieza q, 20 biopsias, 18 GL y 22 citologías (bloques celulares) | 22C3, 28-8, SP-142 SP 263 y 73-10 | 18              | Semejante 22C3, 28-8 y SP263, menor SP142 y mayor 73-10. ICC entre patólogos fue del 0,88-0,93         | Baja concordancia (K 0,11-0,28)                                      |
| <b>Conde (Conde et al. 2018)</b>                      | 69 piezas q (40 cohorte descubrimiento y 29 de validación)            | E1L3N, SP263 y SP142              | 2               | Buena concordancia entre E1L3N y SP263 y baja entre SP263 y SP142. ICC entre patólogos entre 0,92-0,99 | Peor correlación con todos los clones. ICC entre patólogos 0,76-0,81 |

En resumen, todos los estudios de forma más o menos homogénea, llegan a la conclusión de que los clones 22C3 y 28-8 (Dako) y el SP263 (Roche) tienen una tinción semejante (equivalente). El clon SP142 (Roche) tiñe en menor proporción que los otros clones TC y el clon 73-10 (Dako) tiñe en mayor proporción las TC. Por otro lado, se ve que la concordancia interobservador es buena para la valoración de las TC, pero es baja para IC con todos los clones. (**Buttner et al. 2017**).

También se han realizado estudios de armonización usando distintas plataformas de inmunotinción para un mismo anticuerpo, en los que encuentran resultados equivalentes (**Neuman et al. 2016, Ilie et al. 2017, Roge et al. 2017**).

Por otro lado, como ya hemos comentado previamente, se sabe que a pesar de seleccionar los pacientes mediante la expresión de PD-L1 no todos ellos responden al tratamiento y algunos tienen respuestas paradójicas con hiperprogresión. Por ello se están estudiando otros biomarcadores o combinación de biomarcadores que seleccionen de manera más precisa a los pacientes.



**Figura 7.** Clasificación de los tumores basados en la expresión de PD-L1 y la infiltración de linfocitos T (Modificado de Teng, 2015).

Como hemos dicho inicialmente estos tratamientos se basan, no en atacar directamente a la TC, si no en activar de nuevo al SI, para que sea él el que actúe directamente sobre el tumor. Por tanto, es lógico que la célula inflamatoria (realmente efectora) sea importante en la respuesta a los tratamientos de inmunoterapia. Hay autores que basándose en estos dos parámetros de expresión de PD-L1 y linfocitos intratumorales (TIL) dividen los tumores en grupos tipo 1 a 4 (**Teng**

**et al. 2017) (Figura 7)** o como un continuo desde tumores inflamados a no inflamados o desérticos **(Hegde et al. 2016)**. Según esta clasificación, los subtipos 1 o los inflamados, son los que mejor responden a estos tratamientos.

Con respecto a la valoración de los TIL en CPNCP, algunos autores los valoran con técnicas habituales (HE) dividiéndolos en grupos de 0 a 3, según el *score* de la Universidad de Pittsburgh Medical Center **(Horne et al. 2011, Kilic et al. 2011, Feng et al. 2016)** y otros en dos únicos grupos con infiltrado intenso o no intenso **(Brambilla et al. 2016)**. Algunos autores también encuentran relación entre los TIL y la supervivencia libre de enfermedad **(Horne et al. 2011, Kilic et al. 2011, Feng et al. 2016)**.

Recientemente Donnem y col. hacen una revisión de estudios previos, en la que evalúan el impacto pronóstico de los TIL en 797 pacientes con resección quirúrgica, estadios I-III A de CPNCP. Estos autores consideran los linfocitos CD8+, tanto en localización intraepitelial como estromal, como un factor pronóstico positivo. Tienen en cuenta lo que llaman TILs de localización centrales vs periféricos (en el margen invasivo). Además, plantean un *inmunoscore*, complementario al estadio TNM, en las resecciones de CPNCP, para implementar en la clínica, debido a las diferencias que encuentran en el pronóstico entre pacientes del mismo estadio y entre todos los estadios resecables (I a III A) que representan el 20-25% de todos los CPNCP. El “*score*” que proponen se basaría en la combinación del estadio TNM y la valoración de la expresión estromal de linfocitos CD8+. De este modo, proponen a los linfocitos CD8+ estromales como un candidato prometedor de impacto pronóstico positivo en CPNCP y apuntan a que haya una relación con las nuevas dianas de inmunoterapia **(Donnem et al. 2016)**.

Por tanto, existen diferentes cuestiones por resolver en el estudio de la expresión de PD-L1 como biomarcador. El análisis de algunas de ellas constituye la razón final de haber realizado el proyecto actual.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La expresión de PD-L1 y el microambiente (valorado mediante la cantidad de linfocitos T CD8+) pueden tener un valor pronóstico en el cáncer de pulmón de célula no pequeña. Para el estudio de la expresión de PD-L1, los dos clones usados en el estudio (22C3 y 28-8) son equivalentes y su valoración es reproducible (variabilidad inter e intraobservador). Hay una relación entre la expresión de PD-L1 y los TIL (valorando CD8).

### OBJETIVO PRINCIPAL

- Estudiar el potencial valor pronóstico de PD-L1 y del microambiente mediante la valoración automatizada de linfocitos T CD8 con sistema digital automatizado de cuantificación (VENTANA iScan HT), en el carcinoma de pulmón de célula no pequeña en pacientes quirúrgicos. Validación mediante distintos anticuerpos de PD-L1.

### OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Valorar la reproducibilidad entre los distintos anticuerpos de PD-L1 (concordancia intraobservador) en la valoración de la expresión de PD-L1 en la celularidad tumoral y en la celularidad inmune
- Valorar la reproducibilidad entre distintos observadores (concordancia interobservador) en la valoración de la expresión de PD-L1 en la celularidad tumoral y en la celularidad inmune, con distintos anticuerpos.
- Correlacionar las variables clínico-patológicas con la expresión proteica de PD-L1 con los distintos anticuerpos.
- Correlacionar la expresión de PD-L1 con el número y densidad de linfocitos CD8 y su localización en relación al tumor (distintos compartimentos).
- Correlacionar las variables histológicas con el pronóstico (supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global).
- Valorar si las muestras antiguas de material parafinado es un material adecuado para la determinación proteica de PD-L1.
- Correlacionar la expresión proteica con los niveles de expresión génica de ARN de PD-L1.
- Buscar un perfil génico de expresión en relación a la expresión de PD-L1.

- Buscar modelos pronósticos de SLE y SG, con las variables estudiadas y añadiendo a las variables conocidas, la expresión génica.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Selección de los casos

Se han estudiado 53 pacientes con CPNCP en estadios iniciales con resección quirúrgica, diagnosticados en el Hospital Universitario de la Paz entre los años 2005 a 2007, con un periodo de seguimiento de al menos 10 años. El estudio ha pasado el comité ético del Hospital Universitario La Paz (anexo 1).

#### 3.2. Estudio anatomopatológico

**3.2.1. Estudio macroscópico:** Las piezas quirúrgicas correspondían a lobectomías y neumonectomías con linfadenectomías regladas. Se fijaron en formol tamponado al 10% y se sometieron a protocolo habitual de parafinado y procesado (**Lester 2010**). De la descripción macroscópica se recogió el dato de tamaño tumoral.

**3.2.2. Estudio microscópico:** De cada pieza quirúrgica se evaluaron todas las preparaciones histológicas con hematoxilina-eosina (HE) para la clasificación histológica y valoración de los datos morfológicos. Se seleccionó un bloque representativo de cada tumor, evitando las zonas con extensa necrosis o mala fijación, para realizar los estudios de inmunohistoquímica (IHQ) para diagnóstico, para el estudio del microambiente con CD8 y de expresión proteica de PD-L1.

Se revisaron todos los casos reclasificándolos siguiendo los criterios de la nueva clasificación de la OMS 2015 (**Travis et al. 2015**):

- **Subtipos histológicos y grado de diferenciación de adenocarcinoma:** in situ, mínimamente invasivo e invasivo. En todos los tipos se valoró si eran mucinoso o no mucinosos; en los AD invasivos, se especificaron los distintos porcentajes de cada patrón morfológico: bien diferenciado (G1: lepidico); moderadamente diferenciado (G2: acinar y papilar) y pobremente diferenciado (G3: micropapilar y sólido). La morfología cribiforme se incluyó en el patrón acinar siguiendo la clasificación de la OMS 2015, aunque se especificó este patrón ya que algunos autores lo asocian a peor pronóstico (**Kadota et al. 2014**). Hemos asignado un grado final (global) al caso, en función del grado predominante en %, sumados los porcentajes de los patrones del mismo grado histológico. En un caso en el que la proporción era igual entre dos grados se asignó

el mayor. El porcentaje detallado se puede consultar en la tabla anexa con los datos completos de la serie (anexo 2).

○ **Subtipos histológicos y grado de diferenciación de carcinoma epidermoide:** queratinizante (G1, G2 y G3 según tenga mayor o menor proporción de áreas con queratinización y mayor o menor atipia citológica) y no queratinizante (G3); y subtipo especial basaloide.

En los casos que fue necesario se realizó estudio inmunohistoquímico. Se usaron los marcadores TTF1, napsina, p40, p63 y CK5/6, para diferenciar entre AD y CE. Para ver diferenciación neuroendocrina, se usaron los marcadores sinaptofisina, cromogranina y CD56.

Se consideró AD de patrón sólido si el tumor expresaba TTF-1 y/o napsina A; y CE no queratinizante si expresaba p40 y/o p63 y/o CK5/6.

Inicialmente se estudió únicamente TTF1 y p40 y si el resultado fue negativo o dudoso se amplió al resto de marcadores.

La técnica se realizó sobre secciones completas del bloque seleccionado cortado a 3 micras y teñido-procesado de forma automatizada en la plataforma Dako OMNIS de Agilent siguiendo las indicaciones del fabricante. En la siguiente tabla se especifican los detalles de clon, casa comercial, dilución, pretratamiento, incubación y sistema de visualización de los anticuerpos usados (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Técnicas inmunohistoquímicas realizadas para diagnóstico y CD8.

| Anticuerpo           | Clon            | Casa Comercial | Dilución   | Pretratamiento (Ph, °C, min) | Incubación (min, °C) | Sistema de Visualización |
|----------------------|-----------------|----------------|------------|------------------------------|----------------------|--------------------------|
| <b>P63</b>           | DAK-p63         | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>P40</b>           | P40 (M)         | BioCare        | 1:100      | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>CK5/6</b>         | D5/16B4         | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>TTF-1</b>         | 8G7G3/1         | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>Napsina</b>       | NCL-L-Napsina A | Leica          | 1:100      | Ph 6, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>Sinaptofisina</b> | SY38            | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>Cromogranina</b>  | DAK-A3          | Agilent        | 1:100      | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>CD56</b>          | 123C3           | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |
| <b>CD8</b>           | C8/144B         | Agilent        | Prediluido | Ph 9, 95°C, 36'              | 30', 36°C            | EnVision FLEX            |

Posteriormente las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris durante 7 minutos seguido de PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.0, comercial de Agilent) durante 3 minutos.

Se valoraron todas las técnicas siguiendo los criterios ya establecidos (**Conde et al. 2010, Travis et al. 2015**), y se recogieron otros datos histológicos relacionados con el pronóstico (infiltración de la pleura visceral, invasión linfovascular, infiltración perineural, ganglios linfáticos con metástasis y total de ganglios linfáticos aislados, número de figuras de mitosis por 10 campos de gran aumento (cga) (x400) y presencia o no de mitosis atípicas).

### 3.2.3. Estudio de biomarcadores de inmunoterapia (expresión proteica de PD-L1 y TILs)

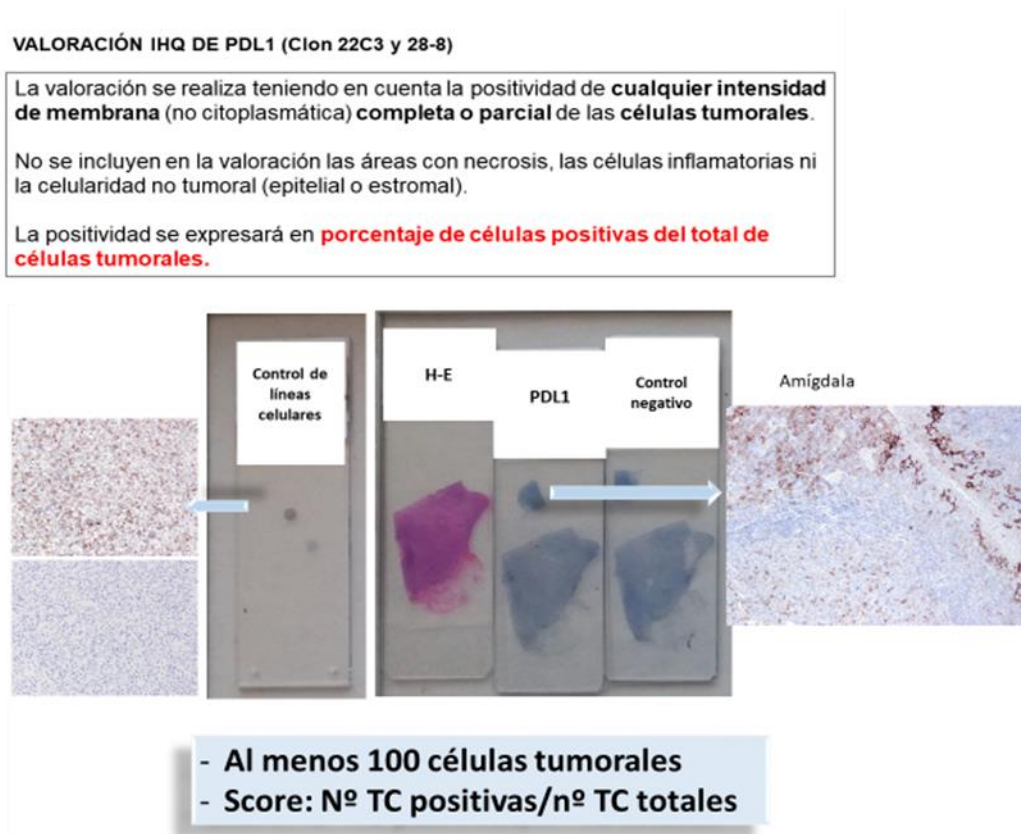
- **Expresión proteica de PD-L1:** se valoraron dos anticuerpos de DAKO. El clon 22C3 (Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 22C3) y el clon 28-8 (Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, Clone 28-8). Ambos usando el kit fármaco diagnóstico y siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial ([https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P03928ES\\_07.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P03928ES_07.pdf) y [https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P03914ES\\_04.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/packageinsert/public/P03914ES_04.pdf)).

El kit de ambos clones contiene los reactivos optimizados usando un linker y un cromógeno. La desparafinación, rehidratación y recuperación antigénica se realizó en el PT link de Agilent, en un solo paso (calentado a 97°C durante 20 minutos a pH 6 en la solución EnVision FLEX Target Retrieval Solution). Después se incubaron con el anticuerpo primario de PD-L1 o con el reactivo de control negativo, con un Mouse linker, seguidos del reactivo de visualización (EnVision FLEX de Agilent) en la plataforma automatizada Autostainer Link 48 de Agilent. Por último, se usó un medio de montaje no acuoso permanente para el montaje final de las preparaciones.

Siguiendo las recomendaciones de la casa comercial en todos los casos se realizaron dos secciones. Una se tiñó con el anticuerpo primario y otra con un reactivo para el control negativo. Con ambos clones se incluyó en cada preparación un control positivo de amígdala (con expresión fuerte de membrana en el epitelio de las criptas y débil en los macrófagos foliculares en el centro germinal). En cada tanda se incluyó además un control de líneas celulares con un control positivo y uno negativo (**Figura 8**).

La valoración se hizo siguiendo las guías de interpretación de Agilent-DAKO ([https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29288\\_22C3-ihc-pharmdx-nsclc-interpretation-manual\\_ce-ivd.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29288_22C3-ihc-pharmdx-nsclc-interpretation-manual_ce-ivd.pdf)) y ([https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29126\\_pd-l1-28-8-nsclc-interpretation-manual\\_row.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29126_pd-l1-28-8-nsclc-interpretation-manual_row.pdf)). En todos los casos había al menos 100 células tumorales valorables (cantidad mínima necesaria para considerar la muestra como valorable). Posteriormente se valoró la expresión en célula tumoral (teniendo en cuenta sólo

la expresión de membrana de cualquier intensidad). Se puntuó como célula positiva cualquiera que tuviera expresión de membrana ya fuera completa o incompleta y se dio una puntuación final (expresada en %) obtenida de la división de células tumorales positivas/ células tumorales totales (TPS) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema de la forma de puntuación de la expresión de PD-L1 y los controles usados.

La valoración de la expresión en la celularidad inmune se realizó usando la guía de interpretación de Roche para el clon SP142, en el que sí es necesaria la valoración de la tinción de la célula inmune para realizar el score final. También se expresó en un porcentaje correspondiente a la proporción que ocupan las IC positivas, de cualquier intensidad, del total del área tumoral ([http://reagent-catalog.roche.com/documents/PD-L1\\_SP142-NSCLC-Brochure.pdf](http://reagent-catalog.roche.com/documents/PD-L1_SP142-NSCLC-Brochure.pdf)).

Tanto en la valoración de la expresión en célula tumoral (TC) como en célula inmune (IC) se recogió el resultado de la puntuación final en porcentaje (%).

Se valoraron ambos parámetros (TC e IC) teniendo en cuenta los principales ensayos clínicos a partir de los cuales se definen los puntos de corte de positividad en relación a distintos fármacos, tanto para TC (22C3 para el fármaco pembrolizumab y 28-8 para nivolumab), como para célula inmune (IC) con el clon SP142; no valorado en nuestro estudio, pero que es el empleado en el desarrollo clínico de atezolizumab.

La valoración de ambos anticuerpos (22C3 y 28-8) se realizó por dos patólogos (I.E. y E.R.) de forma independiente. En el caso de la patóloga I.E., la valoración de ambos clones se hizo de forma simultánea en cada caso y en el caso de la patóloga E.R. de forma separada. Primero valoró todos los casos con el clon 22C3 y posteriormente con el clon 28-8.

La patóloga I.E. estaba entrenada mediante cursos de formación en el estudio de los clones 22C3, 28-8 y SP142; y la patóloga E.R. estaba entrenada en el clon 28-8.

Se valoró también la heterogeneidad de la tinción, siguiendo la definición previamente descrita (**Rehman et al. 2017, Conde et al. 2018**) de patrón geográfico (si se observa al aumento x40) o en mosaico (si se observa al aumento x200)

- **Estudio de microambiente (TILs):**

- a) Valoración morfológica de TIL con H-E: en el bloque seleccionado para las técnicas IHQ se valoró con H-E la densidad de linfocitos T, siguiendo los criterios de Brambilla (**Brambilla et al. 2016**). Considerando solo dos categorías (infiltrado linfoide peritumoral intenso y no intenso). Se denomina infiltrado intenso a aquel infiltrado peritumoral o intratumoral con una densidad semejante a lo que se observa en una metástasis ganglionar o como la definición usada en el carcinoma de mama, con un estroma linfoide de un 50% aproximadamente del volumen tumoral total.
- b) Valoración de los TILs con inmunohistoquímica (CD8): en el bloque seleccionado se realizó IHQ con CD8, para valorar el número absoluto y la densidad de linfocitos T CD8+ en los distintos compartimentos en el tumor. Compartimento intraepitelial (IE), en el estroma intratumoral (EIT) y en el estroma peritumoral (EPT).

Se usó el anticuerpo CD8 (Clon C8/144B de la casa comercial Agilent), sobre secciones completas del bloque seleccionado, cortado a 3 micras y teñido-procesado de forma automatizada en la plataforma Dako OMNIS de Agilent. Las condiciones de pretratamiento usadas con el anticuerpo prediluido fueron a pH 9, 95°C durante 36 minutos; incubación a 36°C durante 30 minutos y usando el sistema de visualización EnVision FLEX de Agilent. Finalmente fueron contrateñidas con Hematoxilina de Harris durante 7 minutos seguido de PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.0, comercial de Agilent) durante 3 minutos.

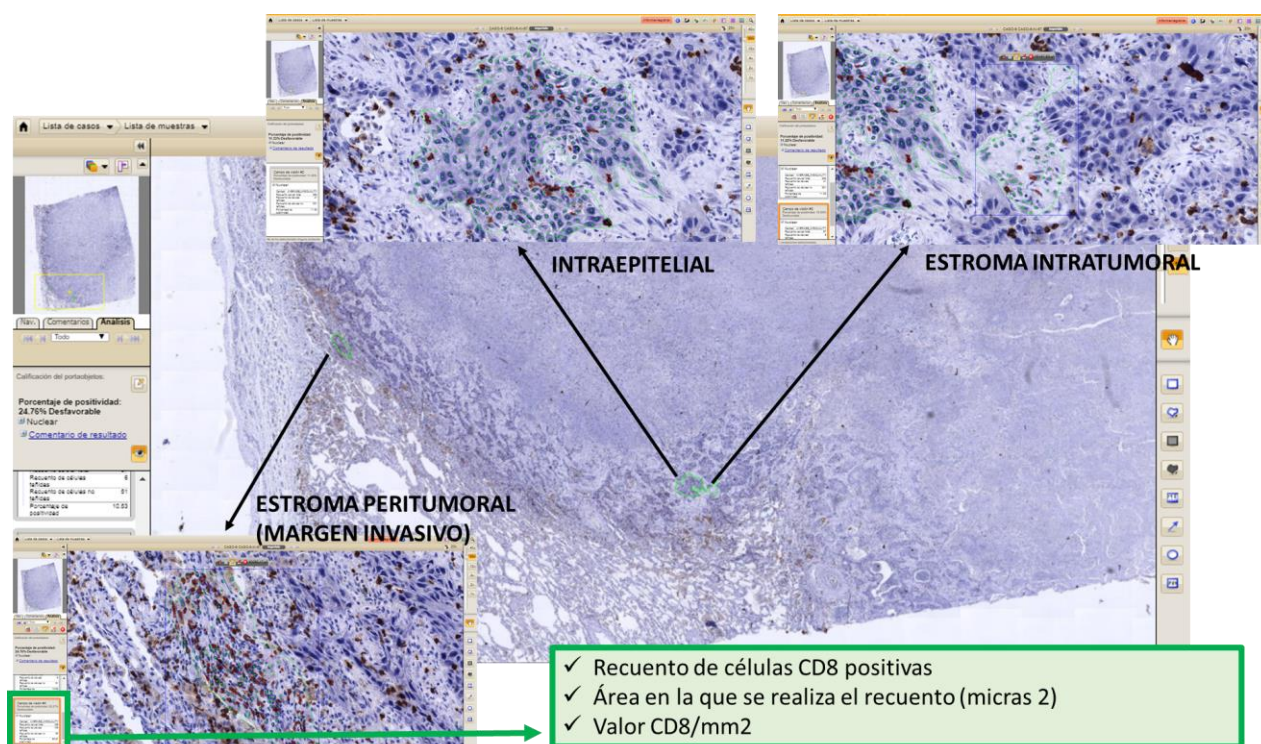
La valoración de CD8 se realizó con patología digital usando la plataforma automatizada VENTANA iScan HT (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, Estados Unidos) en el Hospital de Sanchinarro (Laboratorio de Dianas Terapéuticas), siguiendo la metodología publicada (**Conde et al. 2018**) y que resumimos a continuación. Inicialmente se escanearon las preparaciones de IHQ CD8 a una resolución de x20 (resolución de 0,5 micras por pixel). Las imágenes obtenidas



se procesaron con el software de VENTANA Virtuoso, adaptando el algoritmo usado para la valoración de Ki 67 en el cáncer de mama. Posteriormente sobre las preparaciones digitalizadas se seleccionaron tres áreas manualmente (intraepitelial (en los nidos tumorales), de estroma intratumoral y de estroma peritumoral) para realizar la valoración del número de linfocitos T CD8+ por área (expresada en  $\text{mm}^2$ ). Se seleccionaron zonas donde había una expresión intermedia, intentando seleccionar áreas que no fueran las de menor densidad ni “hot spot” (áreas calientes de mayor densidad de linfocitos CD8). Por último, una vez seleccionada el área se hizo una valoración cuantitativa automatizada, de la que se recogieron los siguientes parámetros:

- ✓ Dimensión del área seleccionada (micras cuadradas;  $\mu\text{m}^2$ )
- ✓ Recuento de células positivas CD8
- ✓ Densidad (células positivas CD8/ $\text{mm}^2$ )

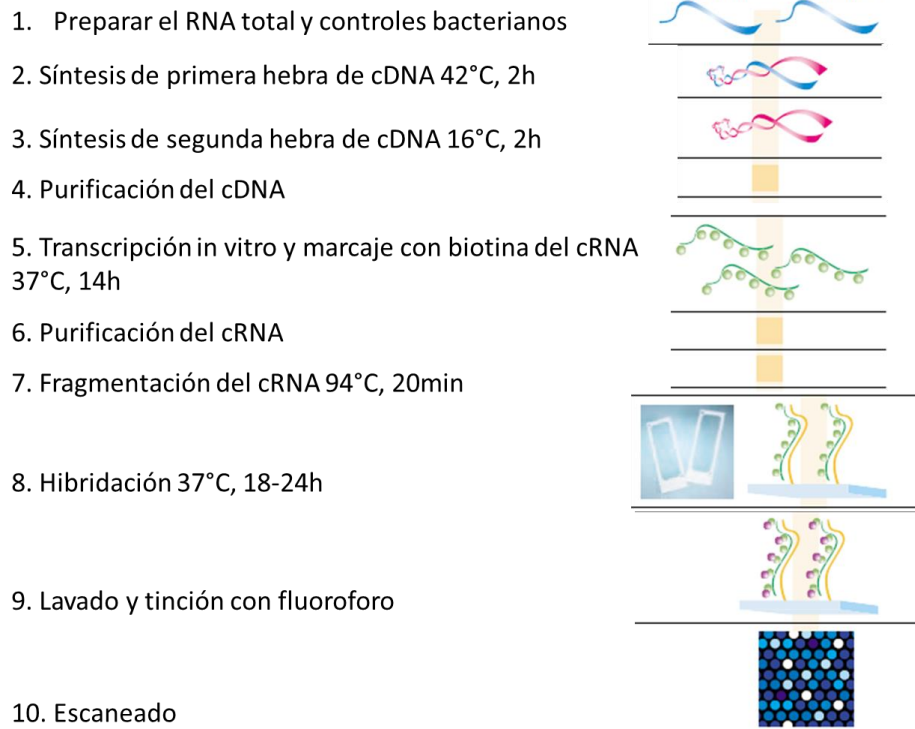
En la **figura 9** se representa gráficamente el procedimiento llevado a cabo.



**Figura 9.** Valoración automatizada de TILs CD8+ en la plataforma VENTANA iScan (Ventana Medical System).

### 3.3. Estudio de arrays de genoma completo (arrays de CodeLink)

Para el estudio de los perfiles de expresión génica de las muestras se utilizó el sistema de bioarray de expresión CodeLink (GE Healthcare/Amersham Biosciences) que permite la monitorización simultánea de los niveles de ARNm de múltiples genes. Las señales captadas en el array se producen debido a la hibridación de las secuencias de ARN marcadas con biotina como consecuencia de su complementariedad frente a las sondas de oligonucleótidos de ADN que se encuentran unidas a una matriz. En este proyecto se ha utilizado el Bioarray Codelink de genoma completo humano dónde se incluyen la mayoría de los genes conocidos y predichos del genoma humano. En concreto, contiene 35.000 genes humanos, genes no anotados y ESTs (marcador de secuencia expresada o *expressed sequence tags*). Se compone de aproximadamente 55.000 sondas de 30 nucleótidos de longitud diseñadas para hibridar con los exones de los transcritos de genes específicos. Las secuencias de estas sondas se seleccionaron de las bases de datos NCBI UniGene (versión 165), RefSeq (versión del 5 de enero de 2004) y dbEST (versión 8 de enero de 2004). El ARN total fue extraído de muestras congeladas de tumor, para realizar el protocolo de análisis con la plataforma de array siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Finalmente se escaneó y se analizaron los resultados de las intensidades lumínicas del array con el software CodeLink Expression Analysis. Todos estos pasos están resumidos en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Esquema del procesado. Modificado del manual de instrucciones del sistema de bioarray de expresión CodeLink (GE Healthcare/Amersham Biosciences).



Para realizar el análisis estadístico de los datos del array se seleccionaron los datos de la siguiente forma: de las 53.423 sondas que tiene el array, quitamos 3 sondas que no cumplían los criterios de calidad recomendados por la casa comercial en ninguna de las 53 muestras tumorales. De éstas, solo 34.693 sondas pertenecen a genes descritos. Posteriormente agrupamos las sondas que correspondían al mismo gen y dimos como valor final de expresión del gen la mediana de los datos obtenidos con las distintas sondas, de forma que nos quedamos con un número de genes total de 18.767. Por último, quitamos 2.167 genes en los que había menos variación entre las muestras (usando 0,4 como el mínimo de varianza permitido) y nos quedamos con 16.600 genes finalmente, que son los que hemos valorado en los distintos análisis estadísticos realizados.

### **3.4. Recogida de datos clínicos (TNM, Estadíaje, Tratamientos (Qx, QT, RT))**

Se revisaron todas las historias clínicas de los pacientes (I.E. y R.R.) en los distintos formatos y plataformas (papel, historia clínica electrónica del Hospital La Paz, base de datos patwin del servicio de anatomía patológica y HORUS) recogiendo los datos de fecha de nacimiento, sexo, hábito tabáquico (no fumador, exfumador o fumador), quimioterapia adyuvante (sí o no) y en el caso de haberse dado tratamiento, esquema del mismo.

En relación con el seguimiento, se recogió si se había producido recaída de la enfermedad o éxitus, y la fecha de los mismos. En el caso de no haberse producido progresión de la enfermedad o éxitus, se recogió la fecha de última revisión o última prueba realizada (TAC) recogida en cualquiera de las plataformas antes referidas.

También se consultó la base de datos nacional de fallecimientos (Índice de defunciones del Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social) en los casos en los que no se encontró ninguna información en las plataformas antes mencionadas. La fecha de última consulta de este registro fue el 19 de agosto de 2016.

Con respecto a los datos de estadificación TNM, el tamaño tumoral y afectación ganglionar se recogieron de los datos reflejados en los informes de anatomía patológica de las piezas quirúrgicas de resección, de las biopsias ganglionares y/o de las punciones realizadas a los pacientes.

### 3.5. Estudio estadístico

La descripción de los datos cualitativos se ha realizado en forma de frecuencias absolutas y porcentajes y los datos cuantitativos mediante media  $\pm$  desviación estándar, mediana, valor mínimo y máximo.

El análisis de la concordancia entre observadores y entre clones, para cada clon en célula tumoral y célula inmune consideradas como cifras absolutas se ha realizado mediante el Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI), considerando los valores entre 0,75-0,9 una buena correlación y  $>0,9$  excelente. Cuando se ha categorizado según los puntos de corte reseñados en ensayos clínicos, se ha usado el índice *Kappa* de Concordancia, considerando los valores *kappa*  $\geq 0,9$  cerca de la perfección de la concordancia; entre 0,80-0,89 buena; 0,70-0,79 moderada y 0,40-0,69 débil. En este caso también se ha estudiado la discrepancia mediante el test de simetría de Mc Nemar.

Se ha analizado la relación entre tabaco (no fumadores vs fumador o exfumador) y los datos de expresión de PD-L1 (Clones), mediante el test de la U de Mann-Whitney.

Se ha estudiado la correlación entre los clones de PD-L1 y los CD8 en los distintos compartimentos, mediante el Coeficiente de correlación de Pearson.

Se ha usado el método de Kaplan-Meier para estimar el tiempo de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. La comparación de curvas de supervivencia según diferentes factores se ha realizado mediante el test 'Log-Rank'. Se han ajustado modelos de Cox para estimar el riesgo asociado para diferentes variables y factores con el tiempo de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, mediante la estimación de los 'Hazard Ratios' (HR) y su intervalo de confianza (IdC) del 95%. Se han estimado los valores crudos, mediante modelos univariantes (no ajustados) como los valores ajustados por otros factores de riesgo (modelo multivariante). Las variables que hemos considerado como candidatos a formar parte de los modelos multivariantes han sido las que resultaron con valores de significación inferiores a 0,2 en los modelos univariantes.

Las variables y factores implicados en este análisis han sido datos clínicos (edad, sexo, tabaco, estadio clínico, tipo de cirugía, inicio de QT, recidiva y éxitus), histológicos (tipo histológico, grado de diferenciación, densidad del infiltrado inflamatorio peritumoral, invasión linfocelular, afectación perineural, afectación pleural, número de mitosis, presencia de mitosis atípicas, ganglios positivos), datos de expresión de PD-L1 (con ambos clones) en TC e IC, datos absolutos y densidad de linfocitos CD8, y expresión de genes.

Se ha usado el índice de Harrell (c-index) para analizar la capacidad predictiva de cada valor estudiado: expresión inmunohistoquímica de PD-L1, genes conocidos asociados a este tipo de tumor (*PD-L1*, *EGFR*, *ROS1*, *ALK*), valores absolutos y densidad de CD8 en los distintos compartimentos, así como para los diferentes modelos multivariantes resultantes. Se toma como valor máximo 1, considerando un buen índice de Harrell entre 0,7-0,8.

Se han usado diferentes métodos de minería de datos (Boosting, ADABOOST), con los niveles de expresión de los 16.600 genes estudiados (microarrays de expresión), para explorar la detección de algunos genes que mejoren de manera independiente las capacidades predictivas de los modelos con factores descritos anteriormente. En estos métodos se ha usado como función de reajuste de datos, el modelo de Cox.

Todas las pruebas estadísticas se considerarán bilaterales y como valores significativos, aquellos p inferiores a 0.05. Los datos se han analizado con el programa estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA) y mediante los programas mBoost, ADABAG y rms de R version 3.5.1.

Para la realización del análisis de expresión diferencial se ha usado el programa LIMMA (Linear Models for Microarray and RNA-Seq Data) tras la normalización (por cuartiles) de los datos de la expresión de los microarrays de las 53 muestras tumorales, para buscar genes diferencialmente expresados con una significación estadísticamente relevante con la corrección del p valor ( $FDR \leq 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudio clínico-patológico de una cohorte de carcinoma de célula no pequeña de pulmón en pacientes sometidos a cirugía (con piezas quirúrgicas).

#### 4.1.1. Análisis descriptivo

Los resultados más relevantes del análisis descriptivo de las variables clínicas y anatomopatológicas están reflejados en la siguiente tabla (**Tabla 8**)

**Tabla 8.** Variables clínicas y anatomopatológicas. Análisis descriptivo.

| VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS              | FRECUENCIA    |
|--|---------------|
| <b>TOTAL</b>                               | 53            |
| <b>Sexo, n (%)</b>                         |               |
| Varones                                    | 45 (84,9)     |
| Mujeres                                    | 8 (15,09)     |
| <b>Edad, media (sd)</b>                    | 66,47 (10,68) |
| <b>Hábito tabáquico, n (%)</b>             |               |
| Fumador                                    | 21 (39,62)    |
| Exfumador                                  | 23 (43,39)    |
| No fumador                                 | 8 (15,09)     |
| Desconocido                                | 1 (1,88)      |
| <b>Subtipo histológico, n (%)</b>          |               |
| Adenocarcinoma (AD)                        | 26 (49,05)    |
| Carcinoma Escamoso (CE)                    | 26 (49,05)    |
| Carcinoma Adenoescamoso                    | 1 (1,88)      |
| <b>Grado de diferenciación (CE), n (%)</b> |               |
| G1 (bien diferenciado)                     | 0 (0)         |
| G2 (moderadamente diferenciado)            | 6 (23,07)     |
| G3 (pobremente diferenciado)               | 20 (76,92)    |
| <b>Grado de diferenciación (AD), n (%)</b> |               |
| G1 (predominante lepidico)                 | 3 (11,53)     |
| G2 (predominante acinar o papilar)         | 15 (57,69)    |
| G3 (predominante sólido o micropapilar)    | 8 (30,6)      |
| <b>Tipo de cirugía, n (%)</b>              |               |
| Lobectomía                                 | 39 (73,58)    |
| Neumonectomía                              | 13 (24,52)    |
| Segmentectomía                             | 1 (1,88)      |
| <b>Localización del tumor, n (%)</b>       |               |
| Lóbulo superior derecho (LSD)              | 10 (18,86)    |
| Lóbulo inferior derecho (LID)              | 3 (5,66)      |
| Lóbulo medio (LM)                          | 1 (1,88)      |
| LSD y LM                                   | 4 (7,54)      |

## Resultados

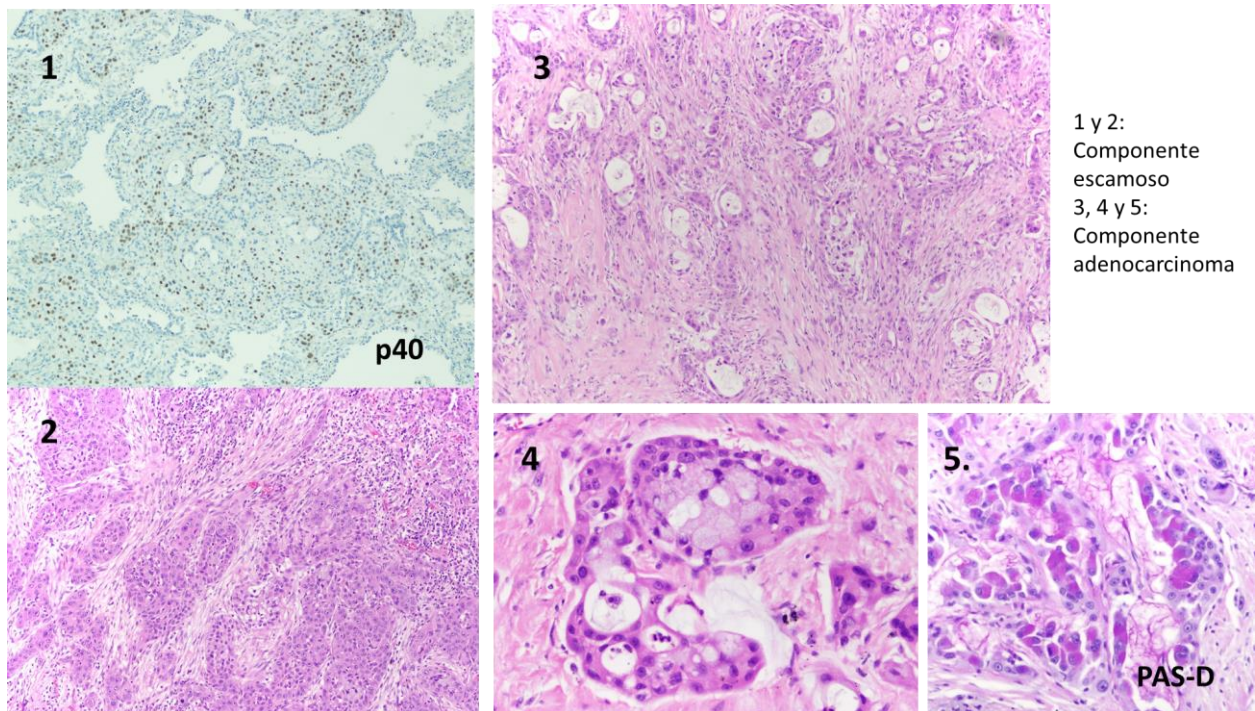
|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| Lóbulo superior izquierdo (LSI)   | 16 (30,18) |
| Lóbulo inferior izquierdo (LII)   | 5 (9,43)   |
| Neumonectomía derecha             | 6 (11,32)  |
| Neumonectomía izquierda           | 7 (13,20)  |
| Segmentectomía anterior de LSD    | 1 (1,88)   |
| <b>Tamaño tumoral (cm), media</b> | 5,54       |
| <b>pT (TNM 8ª Ed), n (%)</b>      |            |
| 1a                                | 0 (0)      |
| 1b                                | 3 (5,66)   |
| 1c                                | 7 (13,20)  |
| 2a                                | 16 (30,18) |
| 2b                                | 6 (11,32)  |
| 3                                 | 9 (16,98)  |
| 4                                 | 12 (22,64) |
| <b>pN (TNM 8ª Ed), n (%)</b>      |            |
| 0                                 | 26 (49,05) |
| 1                                 | 17 (32,07) |
| 2                                 | 10 (18,86) |
| <b>Estadio (TNM 8ª Ed), n (%)</b> |            |
| IA1                               | 0 (0)      |
| IA2                               | 3 (5,66)   |
| IA3                               | 4 (7,54)   |
| IB                                | 5 (9,43)   |
| IIA                               | 3 (5,66)   |
| IIB                               | 18 (33,96) |
| IIIA                              | 15 (28,30) |
| IIIB                              | 5 (9,43)   |
| <b>Muerte, n (%)</b>              | 39 (73,58) |
| <b>Recidiva, n (%)</b>            | 22 (41,50) |
| <b>SLE mediana (meses)</b>        | 119        |
| <b>SG mediana (meses)</b>         | 42         |

Abreviatura: sd= desviación standard.

Del total de casos de la serie original (62 casos) se han descartado 9 (los casos nº 8, 10, 13, 26, 30, 35, 48, 49 y 51), porque correspondían a otros subtipos tumorales (carcinomas neuroendocrinos o carcinoides), a MTS o porque no había material tumoral suficiente para realizar las distintas técnicas. Por tanto, quedaron finalmente 53 casos que son en los que se ha realizado el estudio.

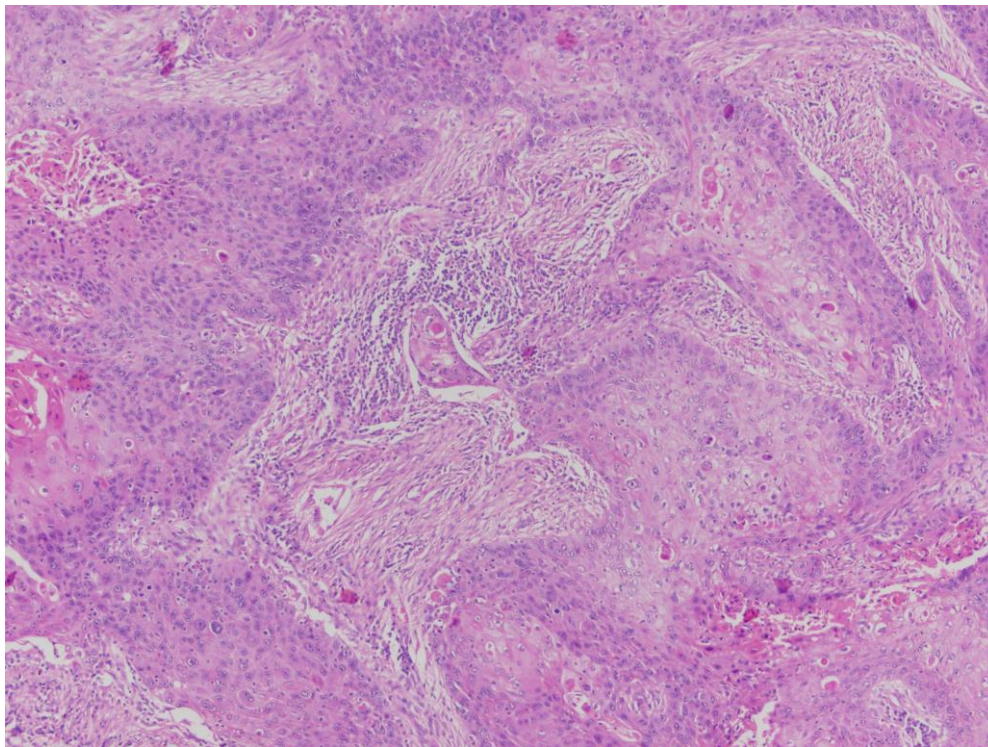
En la serie de 53 casos de CPNCP hay la misma proporción de CE (26) que de AD (26) existiendo solo un caso de carcinoma adenoescamoso (**Figura 11**).





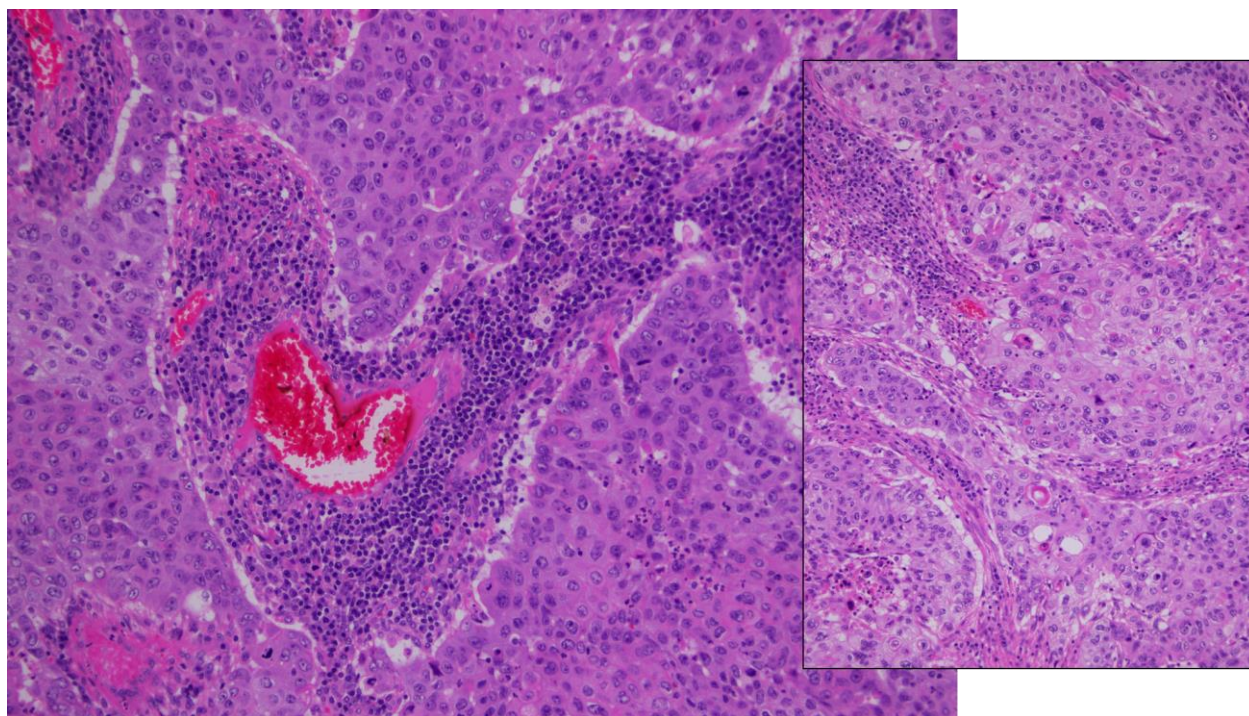
**Figura 11.** Carcinoma Adenoescamoso (Imágenes 1, 2 y 3 H-E x40; 4 H-E x400 y 5 PAS-D x 200)

Con respecto a los CE, la mayor parte son pobremente diferenciados (G3) (queratinizantes y no queratinizantes) (**Figuras 13 y 14**) (20 casos, 77%), seguidos de los moderadamente diferenciados (G2) (**Figura 12**) (6 casos, 23,1%). No hay casos bien diferenciados (G1).

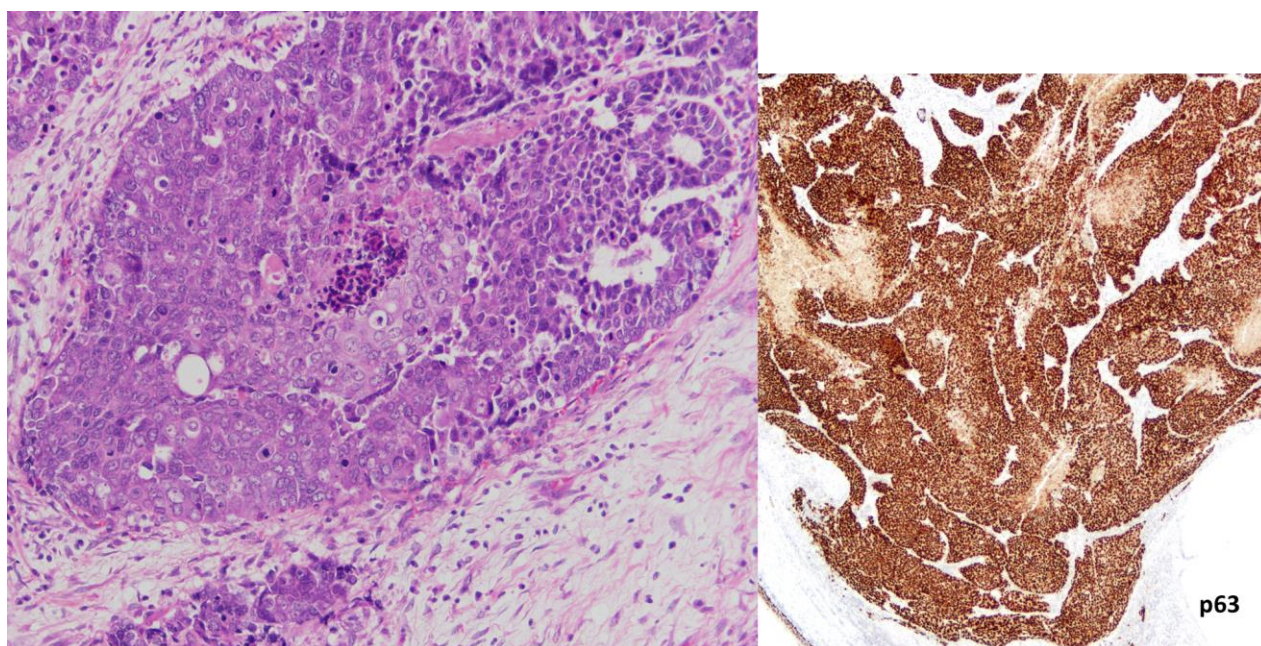


**Figura 12.** Carcinoma Epidermoide Queratinizante, moderadamente diferenciado G2 (H-E x 100).





**Figura 13.** Carcinoma Epidermoide Queratinizante, pobremente diferenciado G3 (H-E Izda. x400; Dcha. x200).



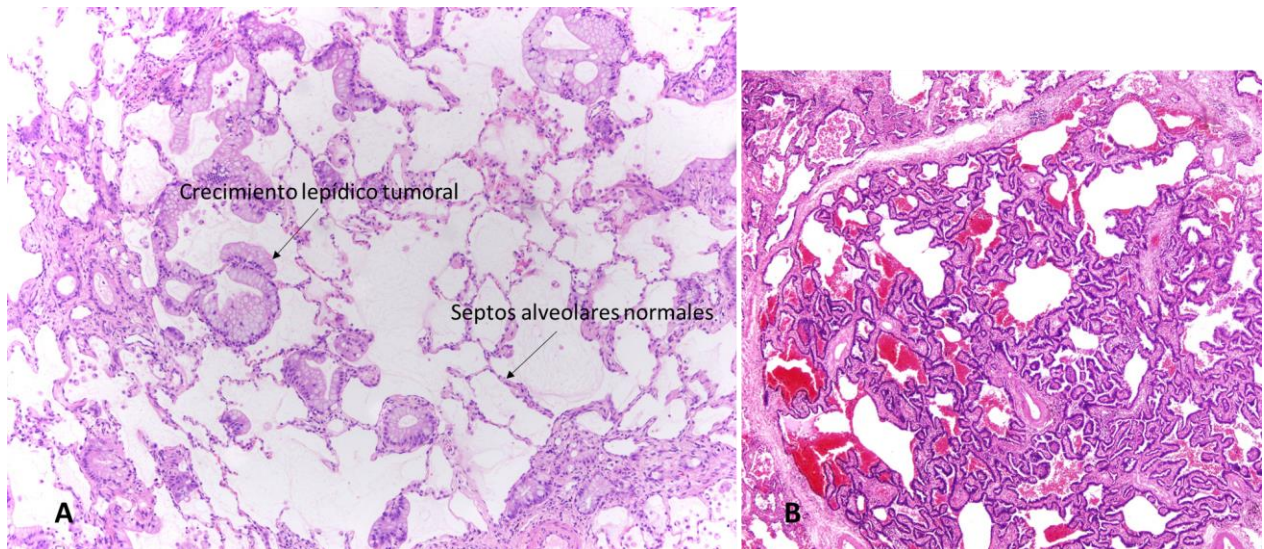
**Figura 14.** Carcinoma Epidermoide No Queratinizante G3 (Izda. H-E x400; Dcha. IHQ p63 x 20).

Dentro del grupo de AD, hemos contabilizado el porcentaje de los distintos patrones de crecimiento que asocian un mismo grado histológico. Bien diferenciados (G1) si el patrón predominante era lepidico (**Figura 15**), moderadamente diferenciados (G2) si eran patrón papilar

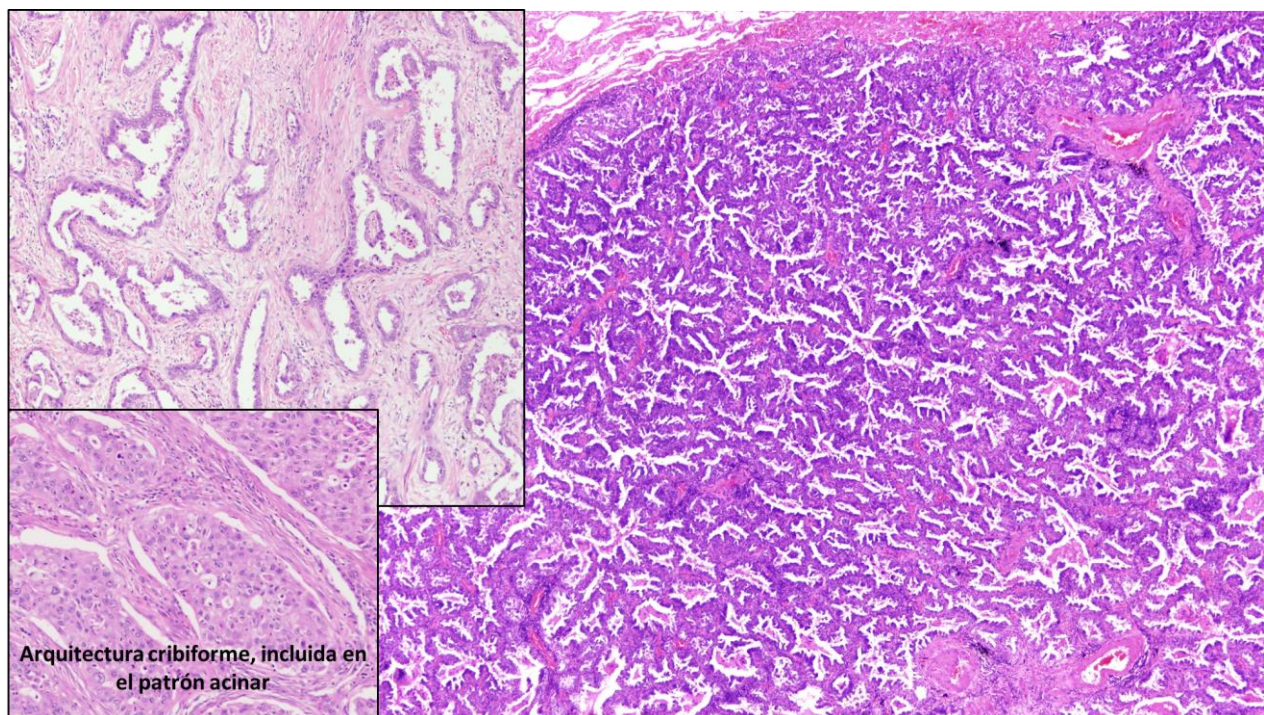


o acinar (**Figuras 16 y 17**) y pobremente diferenciado (G3) si eran de patrón sólido o micropapilar (**Figuras 18 y 19**).

Los AD más frecuentes en nuestra serie son los G2 (15 casos, 57,69%), seguidos de los bien diferenciados G1 (8 casos, 30,6%) y por último los G3 (3 casos, 11,53%). Sin embargo, en 15 casos hay un componente G3, aunque no sea el patrón predominante (10 patrón sólido y 8 micropapilar).

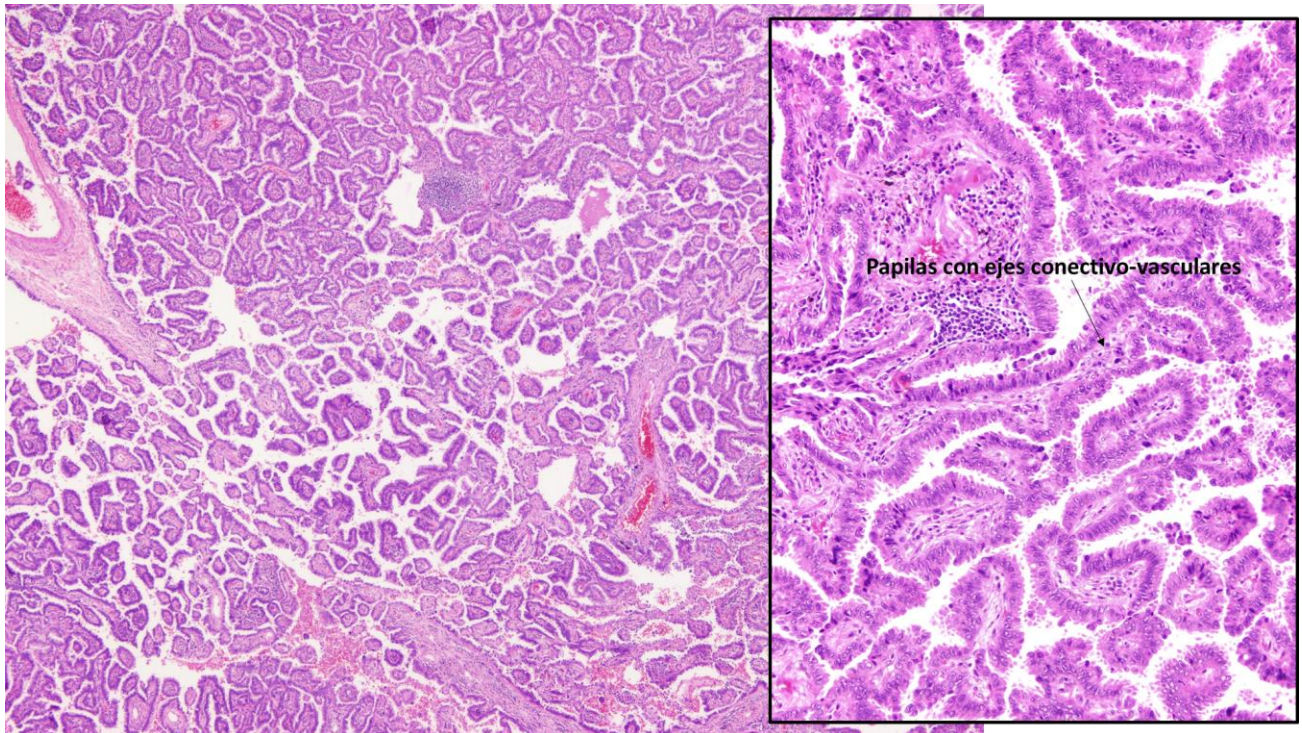


**Figura 15.** Adenocarcinoma de patrón lepidico G1 (A: Mucinoso, H-E x 40 y B: No mucinoso, H-E x 20).

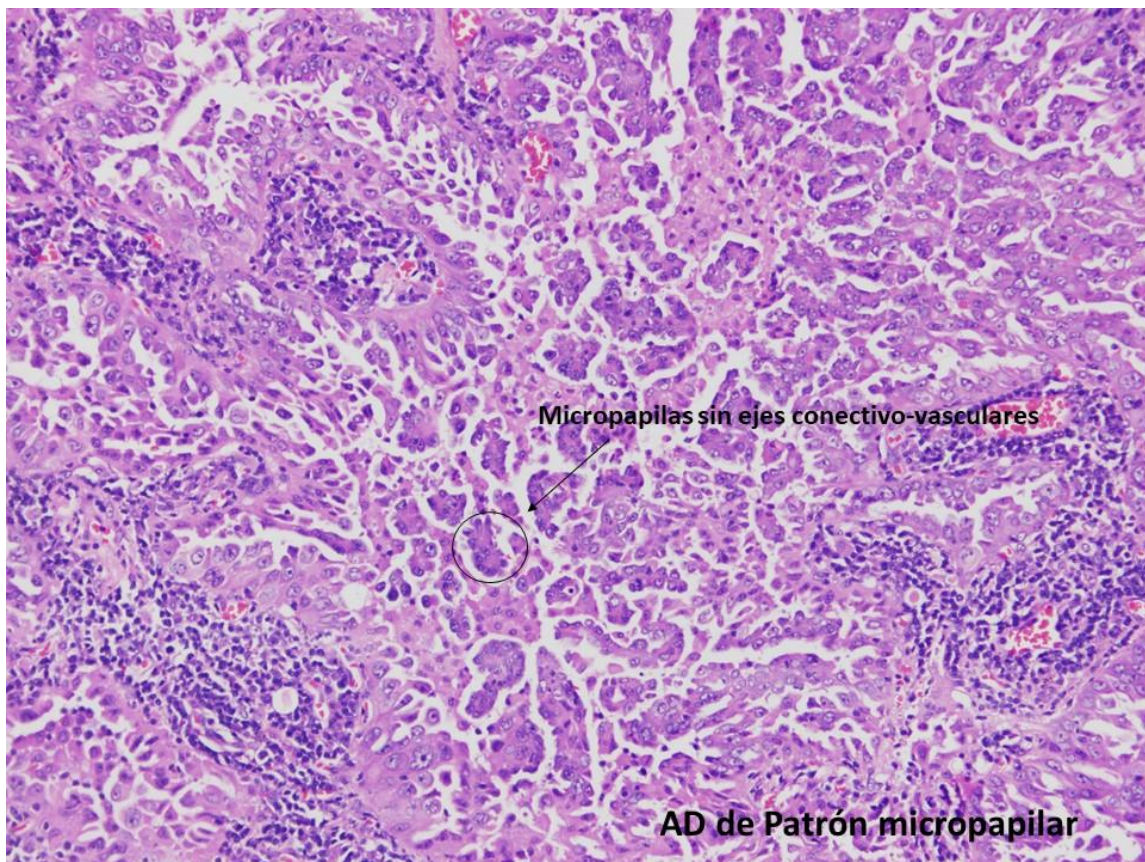


**Figura 16.** Adenocarcinoma de patrón acinar G2 (H-E, Dcha. x 20; Izda. superior e inferior x 200).



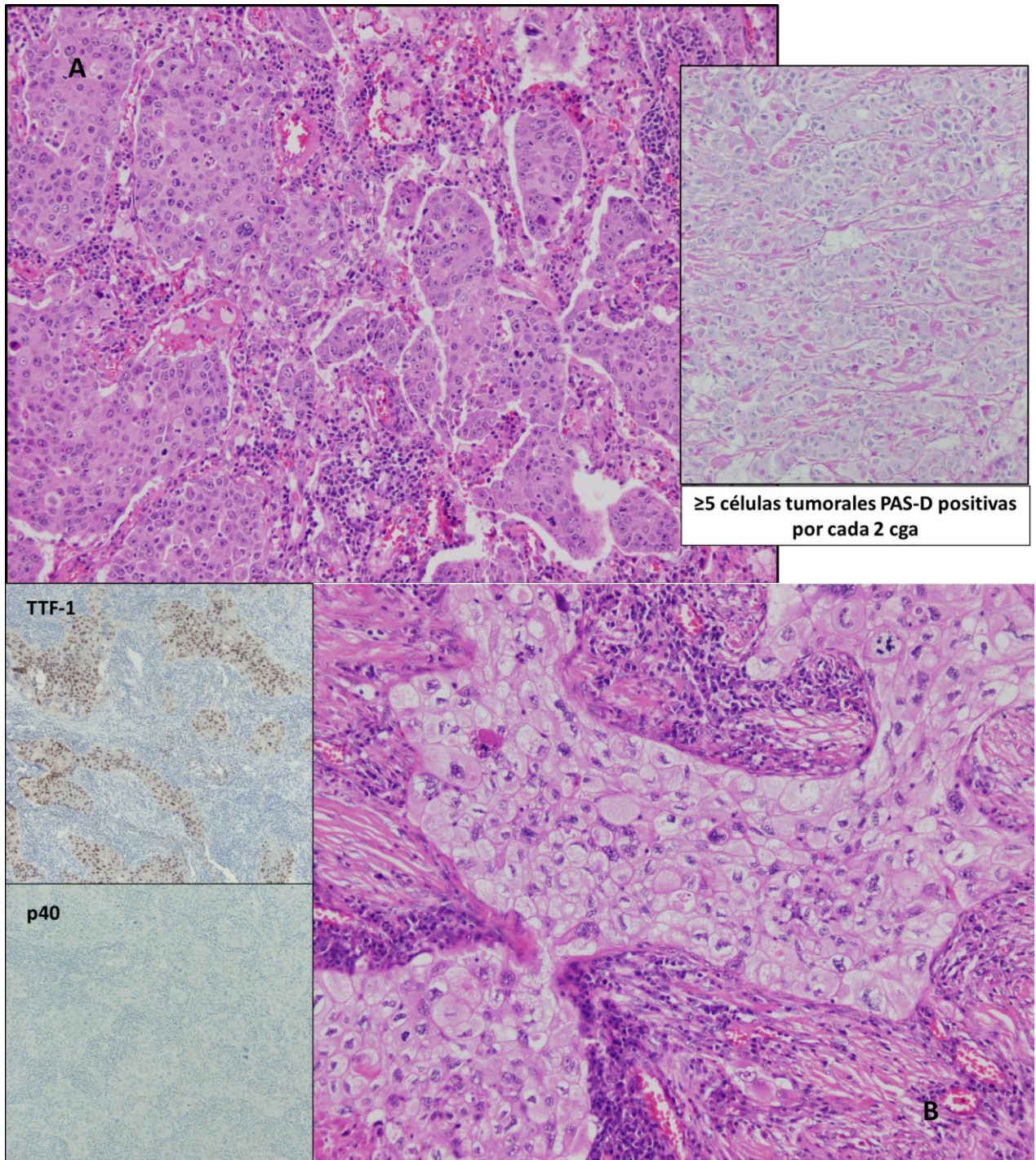


**Figura 17.** Adenocarcinoma de patrón papilar G2 (H-E, Izda. x 40; Dcha. x 100).



**Figura 18.** Adenocarcinoma de patrón micropapilar G3 (H-E x 200)





**Figura 19.** Adenocarcinoma de patrón sólido G3, definido por técnicas histoquímicas (A) (Id H-E x 200; Drcha. PAS-D x 200) o inmunohistoquímicas (B) (Dcha. H-E x 400, Izda. IHQ TTF-1 y p40 x 100).

Siguiendo los nuevos criterios diagnósticos de la WHO 2015 dos de los casos diagnosticados previamente como adenocarcinomas se reclasificaron en carcinomas epidermoides no queratinizantes (casos 24 y 29). Seis de los casos diagnosticados como

carcinoma de célula grande se reclasificaron 3 en CE no queratinizante (casos 5, 19 y 42) y 3 en AD de patrón sólido (casos 28, 44 y 50). Por último, uno diagnosticado de carcinoma neuroendocrino de célula grande se reclasificó como CE no queratinizante con expresión de marcadores neuroendocrinos (caso 27).

Dentro de los adenocarcinomas, independientemente del patrón de crecimiento, 5 son mucinosos y 21 no mucinosos. Los de componente lepidico, la mayoría (4 de 5) son mucinosos.

Había afectación de la pleural visceral en 14 casos (26,41%) y en el resto (39 casos, 73,58%) estaba respetada. Este dato afectó a la reestadificación de los pacientes siguiendo la TNM 8º Ed, en los casos en los que el tumor era menor o igual a 3 cm (en 6 casos de los 14 con pleura afectada).

Con respecto a la afectación ganglionar tenían ganglios linfáticos positivos 27 casos (17 N1 y 10 N2) y sólo en 7 casos de toda la serie se identificó invasión linfovascular y en 2 afectación perineural.

Recibieron tratamiento de QT adyuvante 21 pacientes (un 39,62 %), siendo en la mayoría de los casos el esquema con cisplatino-vinorelbina (en 16 casos), en 4 carboplatino-taxol y en 1 caso cisplatino-gemcitabina. Un caso recibió tratamiento neoadyuvante con cisplatino-gemcitabina-vinorelbina.

Hay un grupo de 14 pacientes no fallecidos (de los cuales 11 estaban vivos en 2018 y del resto encontramos información hasta 2011, 2015 y 2017).

Vamos a analizar el grupo de pacientes vivos en 2018 que corresponde a un 21% aproximadamente del total de casos de la serie. Los subtipos histológicos fueron 9 adenocarcinomas y 2 carcinomas epidermoides (ambos queratinizantes G3 con intensa inflamación peritumoral). De los adenocarcinomas sólo uno tenía un patrón predominante G3 (patrón sólido 100%) también con intenso infiltrado inflamatorio peritumoral. El resto de AD eran, uno de patrón predominante lepidico (75%, G1) y el resto eran de patrón predominante G2 (la mayoría acinar y alguno papilar con porcentajes entre el 60 al 100%). Tenían en general un mayor porcentaje de infiltrado peritumoral intenso (3 de 11, un 27%); que el resto de los pacientes (en 8 de 42, un 19%). Con respecto al tamaño tumoral (pT), hay 7 casos de tamaño  $\leq 3$  cm (2 casos T1b, 3 casos T2b y 2 casos T1c) y 4 casos que son de gran tamaño (entre 5 y 7,5 cm; 3 casos T3 y 1 caso T4). Con respecto al estadio vemos que era muy variado desde estadio I a IIB. En 4 casos eran estadio I (2 casos IA2 y 2 casos IA3), 2 casos estadio IIA, 4 casos estadio IIB y 1 caso estadio IIIB. El de mayor tamaño T4 y con un ganglio afecto prevascular (pN2) (estadio IIIB), corresponde al AD de patrón sólido 100% con intenso infiltrado inflamatorio y una expresión alta

de PD-L1 (del 85%) y homogénea. En la mayoría de los casos, salvo uno (de patrón predominante acinar en el 90%), la pleura visceral estaba respetada. Sin embargo, en ninguno de los casos vivos se identificó invasión linfovascular ni afectación perineural. Con respecto al hábito tabáquico son con más frecuencia no fumadores (en 4 de 11, un 36,36%), que el resto de casos de la serie (4 de 42, un 9,5%). Con respecto al tratamiento sistémico recibido sólo 4 de 11 recibieron QT adyuvante.

#### 4.1.2. Estudio del valor pronóstico de las variables histológicas y clínicas:

En nuestra cohorte se ha visto relación estadísticamente significativa con la **supervivencia libre de enfermedad**, en el análisis univariante (no ajustado) con el tipo histológico adenocarcinoma frente a no adenocarcinoma (HR: 3,13; IdC 95%: 1,33-7,34; p= 0,009).

Sin embargo no se ha visto relación estadísticamente significativa con la supervivencia libre de enfermedad, en el análisis univariante con los siguientes datos clínico-histológicos analizados: el hábito tabáquico (p= 0,68), el inicio del tratamiento de QT (p= 0,65), la edad (p= 0,52), el tamaño tumoral (p= 0,52), el grado histológico G3 (p= 0,33), el nº de mitosis por cga (p= 0,3), la infiltración pleural (p= 0,31), la invasión linfovascular (p= 0,45), la infiltración perineural (p= 0,39), el porcentaje de ganglios positivos del total de ganglios aislados (p= 0,29) ni el número de ganglios positivos (p= 0,19), aunque éste último está próximo a valores significativos.

En el análisis de los adenocarcinomas sin componente micropapilar frente al adenocarcinoma con componente micropapilar (cualquier porcentaje) se observa un aumento del riesgo de recaída (HR) de 3,8; y frente a los no adenocarcinomas (CE y adenoescamoso) del 4,6 (HR). (**Tabla 9**)

En el análisis de la **supervivencia global** también es estadísticamente significativa la relación entre el tipo histológico adenocarcinoma frente a no adenocarcinoma (HR: 2,71; IdC 95%: 1,4-5,22; p= 0,003) y el grado histológico definido como se describe en el epígrafe 3.2.2 entre G3 y no G3 (p = 0,018).

En el análisis de los adenocarcinomas sin componente micropapilar frente a los no adenocarcinomas (CE y adenoescamoso) se mantiene en SG un mayor riesgo de los no AD (HR del 3,4) siendo estadísticamente significativo (**Tabla 9**).



**Tabla 9.** Valores HR, Intervalo de confianza del 95% y p con respecto a SLE y SG en relación a subtipo histológico.

|                            | SLE (univariante) |           |       | SG (univariante) |           |       |
|----------------------------|-------------------|-----------|-------|------------------|-----------|-------|
|                            | HR                | IdC (95%) | p     | HR               | IdC (95%) | p     |
| <b>AD sin micropapilar</b> | 1                 | -         | 0,025 | 1                | -         | 0,10  |
| <b>AD micropapilar</b>     | 3,8               | 1,0-14,3  | 0,047 | 2,3              | 0,8-6,3   | 0,09  |
| <b>No AD</b>               | 4,6               | 1,5-14,2  | 0,007 | 3,4              | 1,5-7,4   | 0,002 |

SLE. supervivencia libre de enfermedad; SG. supervivencia global; AD. Adenocarcinoma

El resto de variables estudiadas no han resultado estadísticamente significativas en relación a la supervivencia global: sexo ( $p= 0,138$ ), edad ( $p= 0,84$ ), hábito tabáquico ( $p= 0,243$ ), inicio del tratamiento con QT ( $p= 0,660$ ), infiltración perineural ( $p= 0,38$ ) y el tamaño tumoral ( $p= 0,94$ ).

La invasión linfovascular ( $p= 0,12$ ), el nº de ganglios positivos ( $p= 0,095$ ), la afectación pleural ( $p= 0,071$ ) y el nº de mitosis ( $p= 0,079$ ); aunque se quedan próximos a la significación no alcanzan valores estadísticamente significativos.

En resumen, encontramos que el subtipo histológico adenocarcinoma tiene mejor SLE y SG que el subtipo no adenocarcinoma. Que el subtipo adenocarcinoma con cualquier porcentaje de patrón micropapilar tiene peor SLE que el adenocarcinoma sin este componente (pareciéndose al grupo de los no AD); y que el grado histológico G3 (ya sea en CE o en AD definido como se describe en el apartado 3.2.2) está relacionado con peor SG.

## 4.2. Estudio de la expresión proteica de PD-L1 en CPNCP quirúrgicos.

### 4.2.1. Análisis descriptivo.

Se realizó el estudio IHQ con los dos clones de PD-L1 (22C3 y 28-8) valorando tanto la positividad en células tumorales como en células inmunes, tal y como se describe en material y métodos (apartado 3.2.3)

Los resultados del análisis descriptivo se detallan en las siguientes tablas. En las primeras tablas se indican los datos de media, mediana, desviación estándar y valores mínimo y máximo para cada clon tanto en TC en ambos observadores (I.E. y E.R.) (**Tabla 10**) como en IC en ambos observadores (I.E y E.R) (**Tabla 11**).

**Tabla 10.** Valores de PD-L1 en células tumorales en ambos observadores.

| <b>Porcentaje de células tumorales (TC) (observador I.E.)</b> |       |         |                     |                  |                  |
|---|-------|---------|---------------------|------------------|------------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>  | Media | Mediana | Desviación estándar | Valor mínimo (%) | Valor máximo (%) |
| 22C3  | 23,91 | 1       | 34,42               | 0                | 95               |
| 28-8  | 25,09 | 2       | 35,92               | 0                | 95               |

| <b>Porcentaje de células tumorales (TC) (observador E.R.)</b> |       |         |                     |              |              |
|---|-------|---------|---------------------|--------------|--------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>  | Media | Mediana | Desviación estándar | Valor mínimo | Valor máximo |
| 22C3  | 23,36 | 0       | 33,59               | 0            | 95           |
| 28-8  | 23,66 | 1       | 32,62               | 0            | 95           |

**Tabla 11.** Valores de PD-L1 en células inmunes en ambos observadores.

| <b>Porcentaje de células inmune (IC) (observador I.E.)</b> |       |         |                     |                  |                  |
|--|-------|---------|---------------------|------------------|------------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>                                     | Media | Mediana | Desviación estándar | Valor mínimo (%) | Valor máximo (%) |
| 22C3   | 3,17  | 1       | 3,66                | 0                | 11               |
| 28-8   | 3,57  | 3       | 3,78                | 0                | 11               |

| <b>Porcentaje de células inmune (IC) (observador E.R.)</b> |       |         |                     |              |              |
|--|-------|---------|---------------------|--------------|--------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>                                     | Media | Mediana | Desviación estándar | Valor mínimo | Valor máximo |
| 22C3   | 2,62  | 0       | 4,48                | 0            | 20           |
| 28-8   | 2,79  | 1       | 3,78                | 0            | 10           |

El porcentaje de expresión de PD-L1 según los puntos de corte usados en los distintos ensayos, valorados tanto en células tumores como en células inmunes valorados por ambos observadores se reflejan en las siguientes tablas (**Tablas 12 y 13**).

**Tabla 12.** Valores de PD-L1 según los puntos de corte usados en los distintos ensayos clínicos, en células tumorales (TC), en ambos observadores.

| <b>Puntos de corte de positividad de células tumorales (TC) (observador I.E.)</b> |             |               |                |                 |               |
|---|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>  | 0%<br>N (%) | 1-4%<br>N (%) | 5-24%<br>N (%) | 25-49%<br>N (%) | ≥50%<br>N (%) |
| 22C3  | 25 (47,2)   | 5 (9,4)       | 7 (13,2)       | 2 (3,8)         | 14 (26,4)     |
| 28-8  | 21 (39,6)   | 9 (17,0)      | 8 (15,1)       | 1 (1,9)         | 14 (26,4)     |

| <b>Puntos de corte de positividad de células tumorales (TC) (observador E.R.)</b> |             |               |                |                 |               |
|---|-------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>  | 0%<br>N (%) | 1-4%<br>N (%) | 5-24%<br>N (%) | 25-49%<br>N (%) | ≥50%<br>N (%) |
| 22C3  | 29 (54,7)   | 2 (3,8)       | 5 (9,4)        | 2 (3,8)         | 15 (28,3)     |
| 28-8  | 25 (47,2)   | 3 (5,7)       | 7 (13,2)       | 5 (9,4)         | 13 (24,5)     |

**Tabla 13.** Valores de PD-L1 según los puntos de corte usados en los distintos ensayos clínicos, en células inmunes (IC), en ambos observadores.

| <b>Puntos de corte de positividad de células inmune (IC) (observador I.E.)</b> |             |               |               |               |
|--|-------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>   | 0%<br>N (%) | 1-4%<br>N (%) | 5-9%<br>N (%) | ≥10%<br>N (%) |
| 22C3   | 17 (32,1)   | 18 (34,0)     | 9 (17,0)      | 9 (17,0)      |
| 28-8   | 16 (30,2)   | 18 (34,0)     | 9 (17,0)      | 10 (18,9)     |

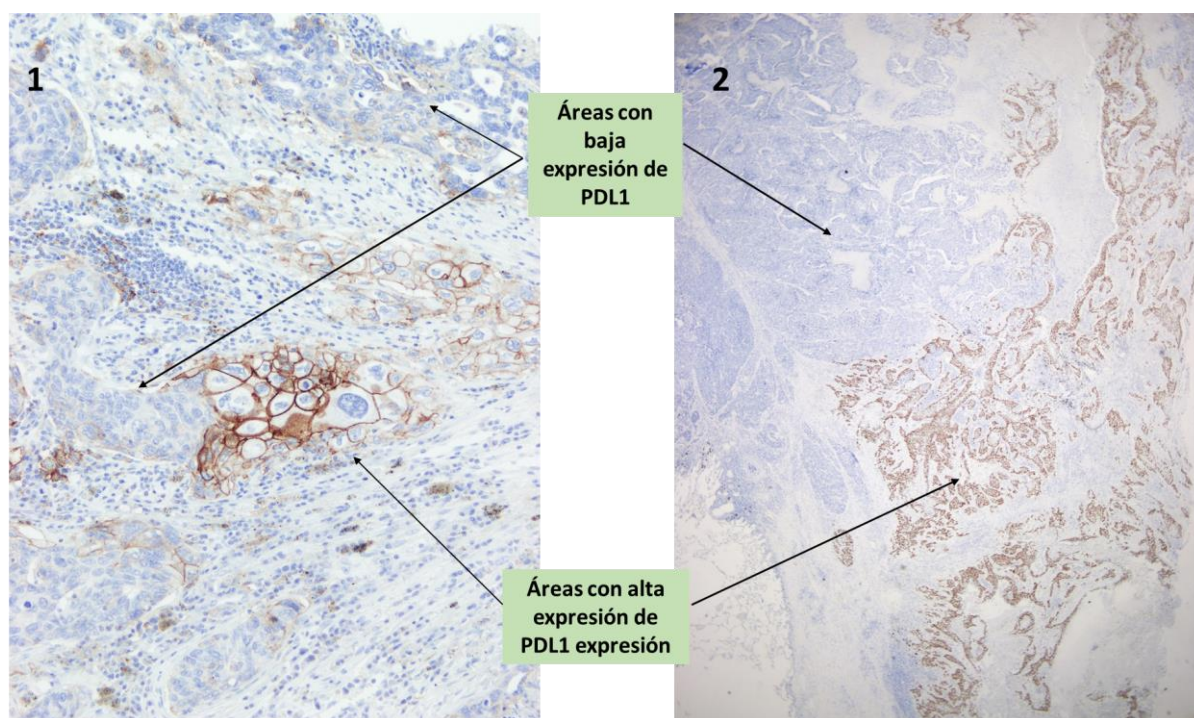
  

| <b>Puntos de corte de positividad de células inmune (IC) (observador E.R.)</b> |             |               |               |               |
|--|-------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Anticuerpo PDL1</b>   | 0%<br>N (%) | 1-4%<br>N (%) | 5-9%<br>N (%) | ≥10%<br>N (%) |
| 22C3   | 29 (54,7)   | 9 (17,0)      | 7 (13,2)      | 8 (15,1)      |
| 28-8   | 26 (49,1)   | 8 (15,1)      | 10 (18,9)     | 9 (17,0)      |

En la valoración de ambos anticuerpos se comprobó la adecuada tinción de los controles externos de línea celulares, en cada grupo de experimentos, y del control de amígdala incluida en cada caso, así como la negatividad de tinción en los cortes de control negativo de cada caso. La tinción fue claramente de membrana y se identificó una mayor tinción de citoplasma inespecífica



con el clon 28-8. Hubo una mayor dificultad en reconocer la positividad de las células inmunes (siguiendo la valoración de la guía de interpretación de Roche del clon SP142, valorando como celularidad inmune positiva cualquier tipo celular ya sea linfocito, macrófago, célula dendrítica o granulocito, con tinción puntiforme, lineal o circunferencial). En una parte de los casos se observó una tinción heterogénea con ambos clones, que se comprobó que era de igual localización en ambos. Se valoró la heterogeneidad según se describe en el apartado 3.2.3 (**Figura 20**)



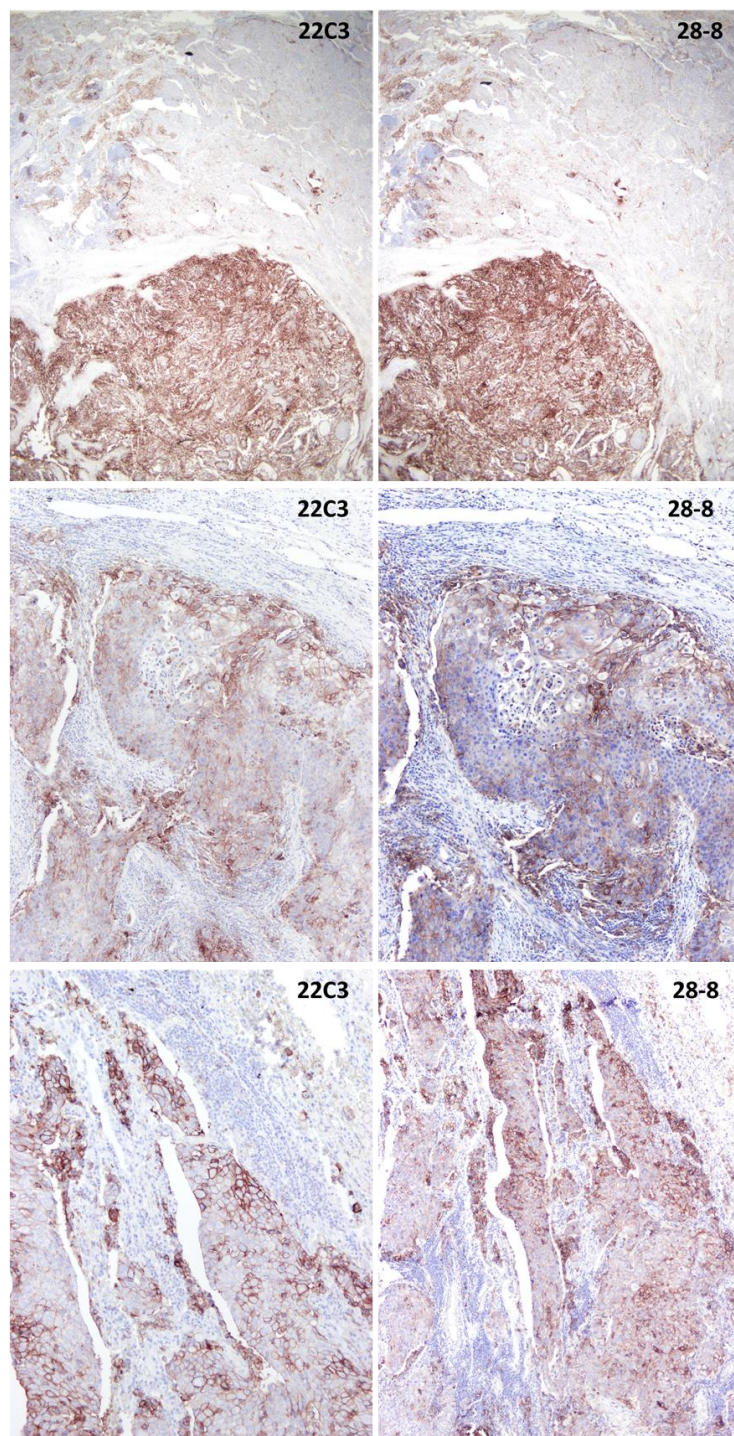
**Figura 20.** Heterogeneidad en la tinción de PD-L1. 1 Patrón mosaico (x200) y 2 Patrón geográfico (x40).

En nuestra serie, en 21 casos (39,62%) la expresión de PD-L1 fue heterogénea, siendo en 13 de tipo mosaico y en 8 tipo geográfico.

En resumen, la expresión proteica de PD-L1 en **célula tumoral**, en nuestra serie con el clon 22C3 fue de alta expresión ( $\geq 50\%$ ) en el 26 al 28% de los casos; de baja expresión (entre el 1-49%) en el 26 al 17% y negativa ( $< 1\%$ ) en el 47 al 55% de los casos. Con el clon 28-8 la expresión fue alta en el 26 al 25%; baja en el 34 al 28% y negativa en el 40 al 47% de los casos. La expresión de PD-L1 en **célula inflamatoria** fue de más del 10% en el 17 al 15% de los casos con el clon 22C3 y del 19 al 17% con el clon 28-8. Encontramos una **expresión heterogénea** en el 40% aproximadamente de los casos.

#### 4.2.2. Correlación entre los diferentes anticuerpos (clones) de PD-L1 intraobservador.

La concordancia en la expresión entre los dos clones de PD-L1 estudiados (22C3 y 28-8), ambos de DAKO, fue buena. Se observó una expresión semejante en célula tumoral y en célula inflamatoria; tanto en porcentaje, como en localización; cómo se puede observar en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Ejemplos de Imágenes de la expresión de PD-L1 con los dos clones en los mismos casos (Imágenes superiores x 20; medias e inferiores x 40).

La concordancia entre los clones 22C3 y 28-8, para la valoración de célula tumoral, valorado por el observador I.E. es buena con un coeficiente de correlación intraclassa (CCI) del 0,99 (IdC 95%: 0,982-0,994;  $p < 0,001$ ); y para la valoración de las células inmunes el CCI es del 0,93 (IdC 95%: 0,870-0,956;  $p < 0,001$ ).

Valorada por el observador E.R., la concordancia entre clones para la valoración de célula tumorales también es buena con un CCI del 0,95 (IdC 95%: 0,909-0,969;  $p < 0,001$  pero, en la valoración de las células inmunes con el observador E.R, hay una baja correlación con un CCI de 0,249 (IdC 95%: -0,024-0,487;  $p 0,037$ ).

En resumen, la concordancia entre los clones 22C3 y 28-8 es buena tanto en la valoración de célula tumoral con ambos observadores (CCI entre 0,99-0,95) como en la valoración de la célula inmune con el observado I.E. (CCI de 0,93).

#### 4.2.3. Correlación interobservador con ambos clones (22C3 y 28-8).

La correlación entre distintos observadores para la valoración de las **células tumorales** es muy buena con ambos clones, valorando el *score* como un continuo. Siendo el CCI de 0,902 (IdC 95%: 0,836-0,942;  $p < 0,001$ ) para el clon 22C3 y de 0,927 (IdC 95%: 0,877-0,957;  $p < 0,001$ ) para el clon 28-8.

Cuando se valoraron los grupos de expresión usados en los ensayos clínicos (<1%/ 1-24%/ 25-49%/  $\geq 50\%$ ), la valoración entre observadores de la TC con el clon 22C3 mostró una concordancia discreta medida por el índice *kappa* que es de 0,68 ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, cuando se agrupa en <1%/ 1-49%/  $\geq 50\%$  el índice *kappa* mejora hasta el 0,76 ( $p < 0,01$ ) y, si se agrupa en <50% y  $\geq 50\%$ , el índice de *kappa* es del 0,86 ( $p < 0,01$ ), siendo este último un buen índice de correlación. Valorados los porcentajes de concordancia por tramos encontramos que en <1% hay una concordancia del 96%, en el valor de 1% es del 40%, en el tramo de 1-4% es del 28,6%, en el tramo del 25-49% es del 50% y en el valor  $\geq 50\%$  del 92,9%.

Con el clon 28-8 el índice de correlación *kappa* en los grupos principales (<1%/ 1-24%/ 25-49%/  $\geq 50\%$ ) es del 0,71 ( $p < 0,01$ ) y también mejora a un índice *kappa* de 0,95 cuando se agrupa en <50% y  $\geq 50\%$ .

Valorados los porcentajes de coincidencias entre los evaluadores por tramos encontramos que en la expresión de <1% hay una concordancia del 96%, en el 1% del 0%, en el tramo del 1-4% del 57,1%, en el del 25-49% del 40% y en la expresión de  $\geq 50\%$  es del 100%.



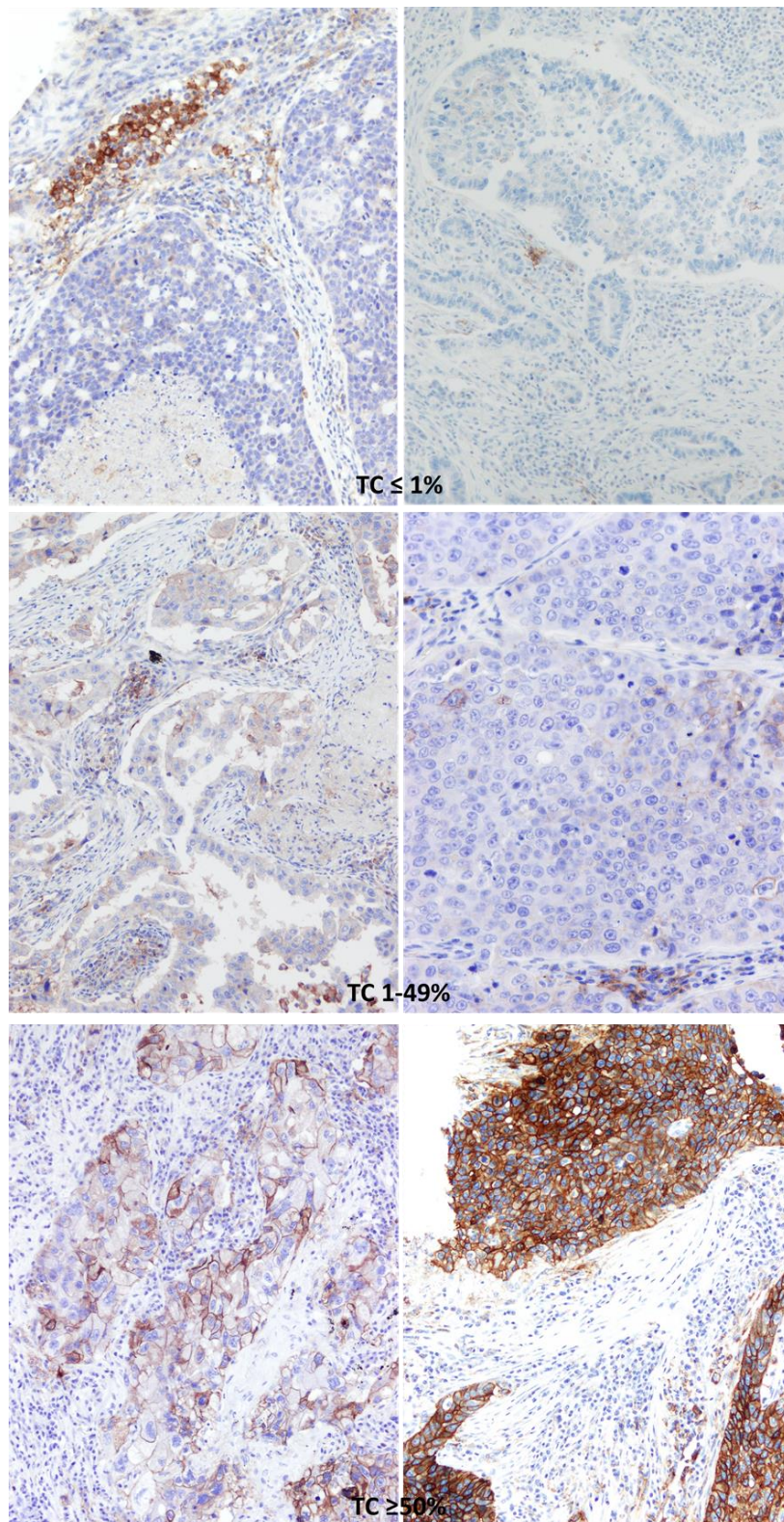
La correlación es discreta en la valoración de la **celularidad inmune**, con un CCI de 0,413 (IdC 95%: 0,163-0,613;  $p= 0,001$ ) con el clon 22C3 y de 0,313 (IdC 95%: 0,053-0,534;  $p= 0,010$ ) con el clon 28-8. En relación con el valor de la expresión en IC por grupos (<1%/ 1-4%/ 5-9%/  $\geq 50\%$ ), la concordancia es pobre con una índice *kappa* de 0,18 ( $p<0,01$ ).

En resumen, la concordancia entre observadores en la valoración de **célula tumoral** es muy buena si la valoramos como una variable continua (CCI del 0,902 con el clon 22C3 y 0,927 con 28-8). Valorado por grupos sólo encontramos una buena concordancia con ambos clones en la valoración de  $\geq 0 < del 50\%$  (*kappa* de entre 0,86 a 0,95). La concordancia es moderada cuando agrupamos en <1%, 1-49% y  $\geq 50\%$  (índice *kappa* del 0,76 con 22C3) y débil a moderada agrupando en <1%, 1-24%, 25-49% y  $\geq 50\%$  (*kappa* de 0,68 y 0,71 con 22C3 y 28-8 respectivamente). La correlación en la **celularidad inflamatoria** es baja evaluada tanto como variable continua (CCI 0,413-0,313) como por grupos (índice *kappa* de 0,18).

#### **4.2.4. Correlación entre la expresión proteica de PD-L1 con las variables clínico-patológicas.**

En la **Figura 22** se muestran unas imágenes representativas de la expresión de PD-L1 en diferentes cortes.

Los resultados muestran que existe una correlación entre la expresión proteica de PD-L1 y las distintas características clínicas y anatomopatológicas, las cuales se reflejan en las siguientes tablas (**Tablas 14 a 17** en TC e IC según los valores obtenidos con el observador I.E. y E.R., respectivamente).



**Figura. 22.** Expresión de PD-L1 en los distintos grupos según ensayos (x 200).

**Tabla 14.** Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en TC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos, del observador I.E. con las características clínico-patológica.

| Variables clínico-patológicas     | 22C3       |                |                        |                         | 28-8           |                        |                         |
|-----------------------------------|------------|----------------|------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|-------------------------|
|                                   | Total      | Negativo (<1%) | Positivo débil (1-49%) | Positivo Fuerte (≥ 50%) | Negativo (<1%) | Positivo débil (1-49%) | Positivo Fuerte (≥ 50%) |
| <b>Total, n (%)</b>               | 53         | 25 (47,16)     | 14 (26,41)             | 14 (26,41)              | 21 (39,62)     | 18 (33,96)             | 14 (26,41)              |
| <b>Edad, media (sd)</b>           | 66,47      | 66,22          | 66,05                  | 67,31                   | 64,76          | 67,80                  | 67,31                   |
| <b>H.T., n (%)</b>                |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Fumador                           | 21 (39,62) | 12 (57,14)     | 3 (14,28)              | 6 (28,57)               | 9 (42,85)      | 6 (28,57)              | 6 (28,57)               |
| Exfumador                         | 23 (43,39) | 7 (30,43)      | 8 (34,78)              | 8 (34,78)               | 6 (26,08)      | 9 (39,13)              | 8 (34,78)               |
| No fumador                        | 8 (15,09)  | 6 (75)         | 2 (25)                 | 0 (0)                   | 6 (75)         | 2 (25)                 | 0 (0)                   |
| Desconocido                       | 1 (1,88)   | 0 (0)          | 1 (100)                | 0 (0)                   | 0 (0)          | 1 (100)                | 0 (0)                   |
| <b>Subtipo histológico, n (%)</b> |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| AD.                               | 26 (49,05) | 15 (57,69)     | 5 (19,23)              | 6 (23,07)               | 14 (53,84)     | 6 (23,07)              | 6 (23,07)               |
| C.E.                              | 26 (49,05) | 9 (34,61)      | 9 (34,61)              | 8 (30,76)               | 7 (26,92)      | 11 (42,30)             | 8 (30,76)               |
| C.AE.                             | 1 (1,88)   | 1 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 1 (100)                | 0 (0)                   |
| <b>Grado CE, n (% de CE)</b>      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G1                                |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G2                                | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| G3                                | 6 (23,07)  | 2 (33,33)      | 3 (50)                 | 1 (16,66)               | 2 (33,33)      | 3 (50)                 | 1 (16,66)               |
|                                   | 20 (76,92) | 7 (35)         | 6 (30)                 | 7 (35)                  | 5 (25)         | 8 (40)                 | 7 (35)                  |
| <b>Grado AD, n (% de AD)</b>      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G1                                |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G2                                | 3 (11,53)  | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| G3                                | 15 (57,69) | 12 (80)        | 3 (20)                 | 0 (0)                   | 11 (73,33)     | 4 (26,66)              | 0 (0)                   |
|                                   | 8 (30,6)   | 0 (0)          | 2 (25)                 | 6 (75)                  | 0 (0)          | 2 (25)                 | 6 (75)                  |
| <b>pT, n (%)</b>                  |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| 1a                                | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| 1b                                | 3 (5,66)   | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               |
| 1c                                | 7 (13,20)  | 3 (42,85)      | 2 (28,57)              | 2 (28,57)               | 3 (42,85)      | 2 (28,57)              | 2 (28,57)               |
| 2a                                | 16 (30,18) | 9 (56,25)      | 4 (25)                 | 3 (18,75)               | 7 (43,75)      | 6 (37,5)               | 3 (18,75)               |
| 2b                                | 6 (11,32)  | 4 (66,66)      | 2 (33,33)              | 0 (0)                   | 3 (50)         | 3 (50)                 | 0 (0)                   |
| 3                                 | 9 (16,98)  | 2 (22,22)      | 3 (33,33)              | 4 (44,44)               | 1 (11,11)      | 4 (44,44)              | 4 (44,44)               |
| 4                                 | 12 (22,64) | 5 (41,66)      | 3 (25)                 | 4 (33,33)               | 5 (41,66)      | 3 (25)                 | 4 (33,33)               |
| <b>pN, n (%)</b>                  |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| 0                                 | 26 (49,05) | 16 (61,53)     | 3 (11,53)              | 7 (26,92)               | 15 (57,69)     | 4 (15,38)              | 7 (26,92)               |
| 1                                 | 17 (32,07) | 6 (35,29)      | 9 (52,94)              | 2 (11,76)               | 3 (17,64)      | 12 (70,58)             | 2 (11,76)               |
| 2                                 | 10 (18,86) | 3 (30)         | 2 (20)                 | 5 (50)                  | 3 (30)         | 2 (20)                 | 5 (50)                  |
| <b>Estadio, n (%)</b>             |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| IA1                               | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| IA2                               | 3 (5,66)   | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               |
| IA3                               | 4 (7,54)   | 2 (50)         | 0 (0)                  | 2 (50)                  | 2 (50)         | 0 (0)                  | 2 (50)                  |
| IB                                | 5 (9,43)   | 4 (80)         | 0 (0)                  | 1 (20)                  | 4 (80)         | 0 (0)                  | 1 (20)                  |
| IIA                               | 3 (5,66)   | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| IIB                               | 18 (33,96) | 7 (38,88)      | 8 (44,44)              | 3 (16,66)               | 3 (16,66)      | 12 (66,66)             | 3 (16,66)               |
| IIIA                              | 15 (28,30) | 5 (33,33)      | 6 (40)                 | 4 (26,66)               | 5 (33,33)      | 6 (40)                 | 4 (26,66)               |
| IIIB                              | 5 (9,43)   | 2 (40)         | 0 (0)                  | 3 (60)                  | 2 (40)         | 0 (0)                  | 3 (60)                  |
| <b>Recidiva, n (%)</b>            |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Si                                | 22 (41,50) | 9 (40,90)      | 6 (27,27)              | 7 (31,81)               | 7 (31,81)      | 8 (36,36)              | 7 (31,81)               |
| No                                | 31 (58,49) | 16 (51,61)     | 8 (25,80)              | 7 (22,58)               | 14 (45,16)     | 10 (32,25)             | 7 (22,58)               |
| <b>Éxito</b>                      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Si                                | 39 (73,58) | 16 (41,02)     | 12 (30,76)             | 11 (28,20)              | 13 (33,33)     | 15 (38,46)             | 11 (28,20)              |
| No                                | 14 (26,41) | 9 (64,28)      | 2 (14,28)              | 3 (21,42)               | 8 (57,14)      | 3 (21,42)              | 3 (21,42)               |

H.T. Hábito Tabáquico; AC. Adenocarcinoma; C.E. Carcinoma Escamoso; C.AE. Carcinoma Adenoescamoso

**Tabla 15.** Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en TC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador E.R. con las características clínico-patológicas.

| Variables clínico-patológicas     | Total      | 22C3           |                        |                         | 28-8           |                        |                         |
|-----------------------------------|------------|----------------|------------------------|-------------------------|----------------|------------------------|-------------------------|
|                                   |            | Negativo (<1%) | Positivo débil (1-49%) | Positivo Fuerte (≥ 50%) | Negativo (<1%) | Positivo débil (1-49%) | Positivo Fuerte (≥ 50%) |
| <b>Total, n (%)</b>               | 53         | 29 (54,71)     | 9 (16,98)              | 15 (28,30)              | 25 (47,16)     | 15 (28,30)             | 13 (24,52)              |
| <b>Edad, media (sd)</b>           | 66,47      | 67,31          | 64,44                  | 66,04                   | 65,75          | 66,60                  | 67,67                   |
| <b>H.T, n (%)</b>                 |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Fumador                           | 21 (39,62) | 13 (61,90)     | 2 (9,52)               | 6 (28,57)               | 12 (57,14)     | 4 (19,04)              | 5 (23,80)               |
| Exfumador                         | 23 (43,39) | 10 (43,47)     | 5 (21,73)              | 8 (34,78)               | 8 (34,78)      | 7 (30,43)              | 8 (34,78)               |
| No fumador                        | 8 (15,09)  | 6 (75)         | 1 (12,5)               | 1 (12,5)                | 5 (62,5)       | 3 (37,5)               | 0 (0)                   |
| Desconocido                       | 1 (1,88)   | 0 (0)          | 1 (100)                | 0 (0)                   | 0 (0)          | 1 (100)                | 0 (0)                   |
| <b>Subtipo histológico, n (%)</b> |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| AD                                | 26 (49,05) | 17 (65,38)     | 2 (7,69)               | 7 (26,92)               | 16 (61,53)     | 4 (15,38)              | 6 (23,07)               |
| C.E.                              | 26 (49,05) | 11(42,30)      | 7 (26,92)              | 8 (30,76)               | 8 (30,76)      | 11 (42,30)             | 7 (26,92)               |
| C.AE.                             | 1 (1,88)   | 1 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 1 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| <b>Grado CE, n (% de CE)</b>      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G1                                | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| G2                                | 6 (23,07)  | 2 (33,33)      | 3 (50)                 | 1 (16,66)               | 2 (33,33)      | 4 (66,66)              | 0 (0)                   |
| G3                                | 20 (76,92) | 9 (45)         | 4 (20)                 | 7 (35)                  | 6 (30)         | 7 (35)                 | 7 (35)                  |
| <b>Grado AD, n (% de AD)</b>      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| G1                                | 3 (11,53)  | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               | 2 (66,66)      | 1 (33,33)              | 0 (0)                   |
| G2                                | 15 (57,69) | 14 (93,33)     | 1 (6,66)               | 0 (0)                   | 13 (86,66)     | 2 (13,33)              | 0 (0)                   |
| G3                                | 8 (30,6)   | 1 (12,5)       | 1 (12,5)               | 6 (75)                  | 1 (12,5)       | 1 (12,5)               | 6 (75)                  |
| <b>pT, n (%)</b>                  |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| 1a                                | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| 1b                                | 3 (5,66)   | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               |
| 1c                                | 7 (13,20)  | 3 (42,85)      | 1 (14,28)              | 3 (42,85)               | 3 (42,85)      | 2 (28,57)              | 2 (28,57)               |
| 2a                                | 16 (30,18) | 10 (62,5)      | 3 (18,75)              | 3 (18,75)               | 7 (43,75)      | 6 (37,5)               | 3 (18,75)               |
| 2b                                | 6 (11,32)  | 5 (83,33)      | 1 (16,66)              | 0 (0)                   | 4 (66,66)      | 2 (33,33)              | 0 (0)                   |
| 3                                 | 9 (16,98)  | 4 (44,44)      | 1 (11,11)              | 4 (44,44)               | 3 (33,33)      | 2 (22,22)              | 4 (44,44)               |
| 4                                 | 12 (22,64) | 5 (41,66)      | 3 (25)                 | 4 (33,33)               | 6 (50)         | 3 (25)                 | 3 (25)                  |
| <b>pN, n (%)</b>                  |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| 0                                 | 26 (49,05) | 18 (69,23)     | 0 (0)                  | 8 (30,76)               | 16 (61,5)      | 3 (11,53)              | 7 (26,92)               |
| 1                                 | 17 (32,07) | 7 (41,17)      | 8 (47,05)              | 2 (11,76)               | 6 (35,29)      | 10 (58,82)             | 1 (5,88)                |
| 2                                 | 10 (18,86) | 4 (40)         | 1 (10)                 | 5 (50)                  | 3 (30)         | 2 (20)                 | 5 (50)                  |
| <b>Estadio, n (%)</b>             |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| IA1                               | 0 (0)      | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 0 (0)          | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| IA2                               | 3 (5,66)   | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               | 2 (66,66)      | 0 (0)                  | 1 (33,33)               |
| IA3                               | 4 (7,54)   | 2 (50)         | 0 (0)                  | 2 (50)                  | 2 (50)         | 0 (0)                  | 2 (50)                  |
| IB                                | 5 (9,43)   | 4 (80)         | 0 (0)                  | 1 (20)                  | 3 (60)         | 1 (20)                 | 1 (20)                  |
| IIA                               | 3 (5,66)   | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   | 3 (100)        | 0 (0)                  | 0 (0)                   |
| IIB                               | 18 (33,96) | 10 (55,55)     | 4 (22,22)              | 4 (22,22)               | 7 (38,88)      | 8 (44,44)              | 3 (16,66)               |
| IIIA                              | 15 (28,30) | 6 (40)         | 5 (33,33)              | 4 (26,66)               | 6 (40)         | 6 (40)                 | 3 (20)                  |
| IIIB                              | 5 (9,43)   | 2 (40)         | 0 (0)                  | 3 (60)                  | 2 (40)         | 0 (0)                  | 3 (60)                  |
| <b>Recidiva, n (%)</b>            |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Si                                | 22 (41,50) | 10 (45,45)     | 4 (18,18)              | 8 (36,36)               | 9 (40,90)      | 7 (31,81)              | 6 (27,27)               |
| No                                | 31 (58,49) | 19 (61,29)     | 5 (16,12)              | 7 (22,58)               | 16 (51,61)     | 8 (25,80)              | 7 (22,58)               |
| <b>Éxito</b>                      |            |                |                        |                         |                |                        |                         |
| Si                                | 39 (73,58) | 19 (48,71)     | 8 (20,51)              | 12 (30,76)              | 16 (41,02)     | 13 (33,33)             | 10 (25,64)              |
| No                                | 14 (26,41) | 10 (71,42)     | 1 (7,14)               | 3 (21,42)               | 9 (64,28)      | 2 (14,28)              | 3 (21,42)               |

H.T. Hábito Tabáquico; AD. Adenocarcinoma; C.E. Carcinoma Escamoso; C.AE. Carcinoma Adenoescamoso

**Tabla 16.** Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en IC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador I.E., con las características clínico-patológicas.

| Variables clínico-patológicas     | 22C3       |                 |                  | 28-8            |                  |
|-----------------------------------|------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|                                   | Total      | Negativo (<10%) | Positivo (≥ 10%) | Negativo (<10%) | Positivo (≥ 10%) |
| <b>Total, n (%)</b>               | 53         | 44 (83,01)      | 9 (16,98)        | 43 (81,13)      | 10 (18,86)       |
| <b>Edad, media (sd)</b>           | 66,47      | 66,09           | 68,29            | 66,16           | 67,77            |
| <b>H.T., n (%)</b>                |            |                 |                  |                 |                  |
| Fumador                           | 21 (39,62) | 18 (85,71)      | 3 (14,28)        | 17 (80,95)      | 4 (19,04)        |
| Exfumador                         | 23 (43,39) | 18 (78,26)      | 5 (21,73)        | 18 (78,26)      | 5 (21,73)        |
| No fumador                        | 8 (15,09)  | 7 (87,5)        | 1 (12,5)         | 7 (87,5)        | 1 (12,5)         |
| Desconocido                       | 1 (1,88)   | 1 (100)         | 0 (0)            | 1 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Subtipo histológico, n (%)</b> |            |                 |                  |                 |                  |
| AD                                | 26 (49,05) | 22 (84,61)      | 4 (15,38)        | 22 (84,61)      | 4 (15,38)        |
| C.E.                              | 26 (49,05) | 21 (80,76)      | 5 (19,23)        | 20 (76,92)      | 6(23,07)         |
| C.AE.                             | 1 (1,88)   | 1 (100)         | 0 (0)            | 1 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Grado CE, n (% de CE)</b>      |            |                 |                  |                 |                  |
| G1                                | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| G2                                | 6 (23,07)  | 5 (83,33)       | 1 (16,66)        | 5 (83,33)       | 1 (16,66)        |
| G3                                | 20 (76,92) | 16 (80)         | 4 (20)           | 15 (75)         | 5 (25)           |
| <b>Grado AD, n (% de AD)</b>      |            |                 |                  |                 |                  |
| G1                                | 3 (11,53)  | 3 (100)         | 0 (0)            | 3 (100)         | 0 (0)            |
| G2                                | 15 (57,69) | 12 (80)         | 3 (20)           | 12 (8)          | 3 (20)           |
| G3                                | 8 (30,6)   | 7 (87,5)        | 1 (12,5)         | 7 (87,5)        | 1 (12,5)         |
| <b>pT, n (%)</b>                  |            |                 |                  |                 |                  |
| 1a                                | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| 1b                                | 3 (5,66)   | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        |
| 1c                                | 7 (13,20)  | 5 (71,42)       | (28,57)          | 5 (71,42)       | 2 (28,57)        |
| 2a                                | 16 (30,18) | 12 (75)         | 4 (25)           | 12 (75)         | 4(25)            |
| 2b                                | 6 (11,32)  | 4 (66,66)       | 2 (33,33)        | 4 (66,66)       | 2 (33,33)        |
| 3                                 | 9 (16,98)  | 9 (100)         | 0 (0)            | 8 (88,88)       | 1 (11,11)        |
| 4                                 | 12 (22,64) | 12(100)         | 0 (0)            | 12(100)         | 0 (0)            |
| <b>pN, n (%)</b>                  |            |                 |                  |                 |                  |
| 0                                 | 26 (49,05) | 22 (84,61)      | 4 (15,38)        | 21 (80,76)      | 5 (19,23)        |
| 1                                 | 17 (32,07) | 13 (76,47)      | 4 (23,52)        | 13 (76,47)      | 4 (23,52)        |
| 2                                 | 10 (18,86) | 9 (90)          | 1 (10)           | 9 (90)          | 1 (10)           |
| <b>Estadio, n (%)</b>             |            |                 |                  |                 |                  |
| IA1                               | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| IA2                               | 3 (5,66)   | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        |
| IA3                               | 4 (7,54)   | 3 (75)          | 1 (25)           | 3 (75)          | 1 (25)           |
| IB                                | 5 (9,43)   | 4 (80)          | 1 (20)           | 4 (80)          | 1 (20)           |
| IIA                               | 3 (5,66)   | 2 (66,66)       | 1 (3,33)         | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        |
| IIB                               | 18 (33,96) | 14 (77,77)      | 4 (22,22)        | 13 (72,22)      | 5 (27,77)        |
| IIIA                              | 15 (28,30) | 14 (93,33)      | 1 (6,66)         | 14 (93,33)      | 1(6,66)          |
| IIIB                              | 5 (9,43)   | 5 (100)         | 0 (0)            | 5 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Recidiva, n (%)</b>            |            |                 |                  |                 |                  |
| Si                                | 22 (41,50) | 19 (86,36)      | 3 (13,63)        | 19 (86,36)      | 3(13,63)         |
| No                                | 31 (58,49) | 25 (80,64)      | 6 (19,35)        | 24 (77,41)      | 7 (22,58)        |
| <b>Éxito</b>                      |            |                 |                  |                 |                  |
| Si                                | 39 (73,58) | 31 (79,48)      | 8 (20,51)        | 31 (79,48)      | 8 (20,51)        |
| No                                | 14 (26,41) | 13 (92,85)      | 1 (7,14)         | 12 (85,71)      | 2 (14,28)        |

H.T. Hábito Tabáquico; AD. Adenocarcinoma; C.E. Carcinoma Escamoso; C.AE. Carcinoma Adenoescamoso



**Tabla 17.** Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en IC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador E.R. con las características clínico-patológicas.

| Variables clínico-patológicas     | 22C3       |                 |                  | 28-8            |                  |
|-----------------------------------|------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
|                                   | Total      | Negativo (<10%) | Positivo (≥ 10%) | Negativo (<10%) | Positivo (≥ 10%) |
| <b>Total, n (%)</b>               | 53         | 45 (84,90)      | 8 (15,09)        | 44 (83,01)      | 9 (16,98)        |
| <b>Edad, media (sd)</b>           | 66,47      | 66,21           | 67,87            | 66,84           | 64,63            |
| <b>H.T., n (%)</b>                |            |                 |                  |                 |                  |
| Fumador                           | 21 (39,62) | 17 (80,95)      | 4 (19,04)        | 17 (80,95)      | 4 (19,04)        |
| Exfumador                         | 23 (43,39) | 19 (82,60)      | 4 (17,39)        | 19 (82,60)      | 4 (17,04)        |
| No fumador                        | 8 (15,09)  | 8 (100)         | 0 (0)            | 7 (87,5)        | 1 (12,5)         |
| Desconocido                       | 1 (1,88)   | 1 (100)         | 0 (0)            | 1 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Subtipo histológico, n (%)</b> |            |                 |                  |                 |                  |
| AD                                | 26 (49,05) | 24 (92,30)      | 2 (7,69)         | 22 (84,61)      | 4 (15,38)        |
| C.E.                              | 26 (49,05) | 20 (76,92)      | 6 (23,07)        | 21 (80,76)      | 5 (19,23)        |
| C.AE.                             | 1 (1,88)   | 1 (100)         | 0 (0)            | 1 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Grado CE, n (% de CE)</b>      |            |                 |                  |                 |                  |
| G1                                | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| G2                                | 6 (23,07)  | 4 (66,66)       | 2 (33,33)        | 4 (66,66)       | 2 (33,33)        |
| G3                                | 20 (76,92) | 16 (80)         | 4 (20)           | 17 (85)         | 3 (15)           |
| <b>Grado AD, n (% de AD)</b>      |            |                 |                  |                 |                  |
| G1                                | 3 (11,53)  | 3 (100)         | 0 (0)            | 3 (100)         | 0 (0)            |
| G2                                | 15 (57,69) | 13 (86,66)      | 2 (13,33)        | 13 (86,66)      | 2 (13,33)        |
| G3                                | 8 (30,6)   | 8 (100)         | 0 (0)            | 6 (75)          | 2 (25)           |
| <b>pT, n (%)</b>                  |            |                 |                  |                 |                  |
| 1a                                | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| 1b                                | 3 (5,66)   | 1 (33,33)       | 2 (66,66)        | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        |
| 1c                                | 7 (13,20)  | 6 (85,71)       | 1 (14,28)        | 6 (85,71)       | 1 (14,28)        |
| 2a                                | 16 (30,18) | 13 (81,25)      | 3 (18,75)        | 12 (75)         | 4(25)            |
| 2b                                | 6 (11,32)  | 6 (100)         | 0 (0)            | 5 (83,33)       | 1 (16,66)        |
| 3                                 | 9 (16,98)  | 8 (88,88)       | 1 (11,11)        | 7 (77,77)       | 2 (22,22)        |
| 4                                 | 12 (22,64) | 11 (91,66)      | 1 (8,33)         | 12(100)         | 0 (0)            |
| <b>pN, n (%)</b>                  |            |                 |                  |                 |                  |
| 0                                 | 26 (49,05) | 23 (88,46)      | 3 (11,53)        | 23 (88,46)      | 3 (11,53)        |
| 1                                 | 17 (32,07) | 12 (70,58)      | 5 (29,41)        | 12 (70,58)      | 5 (29,41)        |
| 2                                 | 10 (18,86) | 10 (100)        | 0 (0)            | 9 (90)          | 1 (10)           |
| <b>Estadio, n (%)</b>             |            |                 |                  |                 |                  |
| IA1                               | 0 (0)      | 0 (0)           | 0 (0)            | 0 (0)           | 0 (0)            |
| IA2                               | 3 (5,66)   | 1 (33,33)       | 2 (66,66)        | 2 (66,66)       | 1 (33,33)        |
| IA3                               | 4 (7,54)   | 4 (100)         | 0 (0)            | 4 (100)         | 0 (0)            |
| IB                                | 5 (9,43)   | 4 (80)          | 1 (20)           | 4 (80)          | 1 (20)           |
| IIA                               | 3 (5,66)   | 3 (100)         | 0 (0)            | 3 (100)         | 0 (0)            |
| IIB                               | 18 (33,96) | 15 (83,33)      | 3 (16,66)        | 13 (72,22)      | 5 (27,77)        |
| IIIA                              | 15 (28,30) | 13 (86,66)      | 2 (13,33)        | 13 (86,66)      | 2 (13,33)        |
| IIIB                              | 5 (9,43)   | 5 (100)         | 0 (0)            | 5 (100)         | 0 (0)            |
| <b>Recidiva, n (%)</b>            |            |                 |                  |                 |                  |
| Si                                | 22 (41,50) | 19 (86,36)      | 3 (13,63)        | 18 (81,81)      | 4 (18,18)        |
| No                                | 31 (58,49) | 26 (83,87)      | 5 (16,12)        | 26 (83,87)      | 5 (16,12)        |
| <b>Éxito</b>                      |            |                 |                  |                 |                  |
| Si                                | 39 (73,58) | 32 (82,05)      | 7 (17,94)        | 32 (82,05)      | 7 (17,94)        |
| No                                | 14 (26,41) | 13 (92,85)      | 1 (7,14)         | 12 (85,71)      | 2 (14,28)        |

H.T. Hábito Tabáquico; AD. Adenocarcinoma; C.E. Carcinoma Escamoso; C.AE. Carcinoma Adenoescamoso

Hemos realizado el análisis estadístico con los datos de expresión del observador I.E.

Desde el punto de vista descriptivo, destacamos que entre los pacientes no fumadores ninguno tenía una fuerte expresión de PD-L1 en TC. Dentro del subgrupo de adenocarcinomas todos los de alta expresión de PD-L1 eran de patrón predominante G3. Por último, la mayoría de los pacientes no éxitos (9 de los 14, un 64%), son negativos para PD-L1, con ambos clones.

Hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en TC usando los puntos de corte de los ensayos (<1%-1-49%->50%) y el grado de diferenciación G3 ( $p=0,001$  con el clon 22C3 y de  $p < 0,001$  con el clon 28-8) y con el estadio N ( $p=0,013$  con el clon 22C3 y  $p=0,001$  con el clon 28-8). Siendo mayor la expresión en los casos G3 y con mayor estadio N. También se observó una fuerte correlación, usando el test de la U de Mann-Whitney, entre el hábito tabáquico y la mayor expresión de PD-L1 en TC, como se refleja en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Correlación entre la expresión media de PD-L1 con observador I.E. y el hábito tabáquico.

| Expresión de PD-L1 en TC | Hábito tabáquico             |                      | p     |
|--------------------------|------------------------------|----------------------|-------|
|                          | Exfumador/Fumador (44 casos) | No fumador (8 casos) |       |
| <b>22C3 media (sd)</b>   | 28,55 (37,23)                | 0,75 (1,75)          | 0,048 |
| <b>28-8 media (sd)</b>   | 29,55 (37,85)                | 3,13 (7,03)          | 0,037 |

No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en IC, ni en TC con el resto de variables clínico-patológicas.

Hemos realizado el análisis también según tipo histológico y hábito tabáquico, como se refleja en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Correlación entre la expresión media de PD-L1 en TC y en IC, el tipo histológico y el hábito tabáquico.

| Clon PD-L1 | Hábito tabáquico | Tipo histológico (N) | Media | SD     | Valor mínimo | Valor máximo |
|------------|------------------|----------------------|-------|--------|--------------|--------------|
| 22C3 en TC | no               | AD (8)               | 0,75  | 1,753  | 0            | 0            |
|            | si               | AD (18)              | 28,35 | 39,596 | 0            | 95           |
|            |                  | No AD (26)           | 28,67 | 36,436 | 0            | 90           |
| Total      |                  |                      | 24,27 | 35,661 | 0            | 95           |
| 22C3 en IC | no               | AD (8)               | 2     | 3,423  | 0            | 10           |
|            | si               | AD (18)              | 3,65  | 3,570  | 0            | 10           |
|            |                  | No AD (26)           | 3,33  | 3,843  | 0            | 11           |
| Total      |                  |                      | 3,23  | 3,666  | 0            | 11           |
| 28-8 en TC | no               | AD (8)               | 3,13  | 7,039  | 0            | 20           |
|            | si               | AD (18)              | 29,65 | 41,090 | 0            | 95           |
|            |                  | No AD (26)           | 29,48 | 36,470 | 0            | 90           |
| Total      |                  |                      | 25,48 | 36,155 | 0            | 95           |
| 28-8 en IC | no               | AD (8)               | 2,38  | 3,583  | 0            | 10           |
|            | si               | AD (18)              | 4     | 3,674  | 0            | 10           |
|            |                  | No AD (26)           | 3,78  | 3,955  | 0            | 11           |
| Total      |                  |                      | 3,63  | 3,778  | 0            | 11           |

En resumen, encontramos que hay una asociación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico, el grado histológico G3 y el estadio N, con una mayor expresión de PD-L1 en TC.

#### 4.2.5. Estudio del valor pronóstico de la expresión proteica de PD-L1.

Los análisis de SG y SLE en relación con la expresión de PD-L1 no mostraron significación estadística. Solo hay un valor próximo a la significación que es la expresión en IC con el clon 28-8 en relación a SLE, como se detalla a continuación.

En relación con la **supervivencia libre de enfermedad**, los valores en TC con el clon 22C3 y con el clon 28-8 son  $p = 0,79$  y  $p = 0,85$ , respectivamente; y en la valoración de IC con el clon 22C3  $p = 0,47$  y con el clon 28-8  $p = 0,15$ .

Con respecto a la relación con la **supervivencia global**, en la valoración de TC los valores son  $p = 0,78$  y  $p = 0,83$  con los clones 22C3 y 28-8, respectivamente. En IC, son de  $p = 0,76$  y  $p = 0,44$  con los clones 22C3 y 28-8, respectivamente.

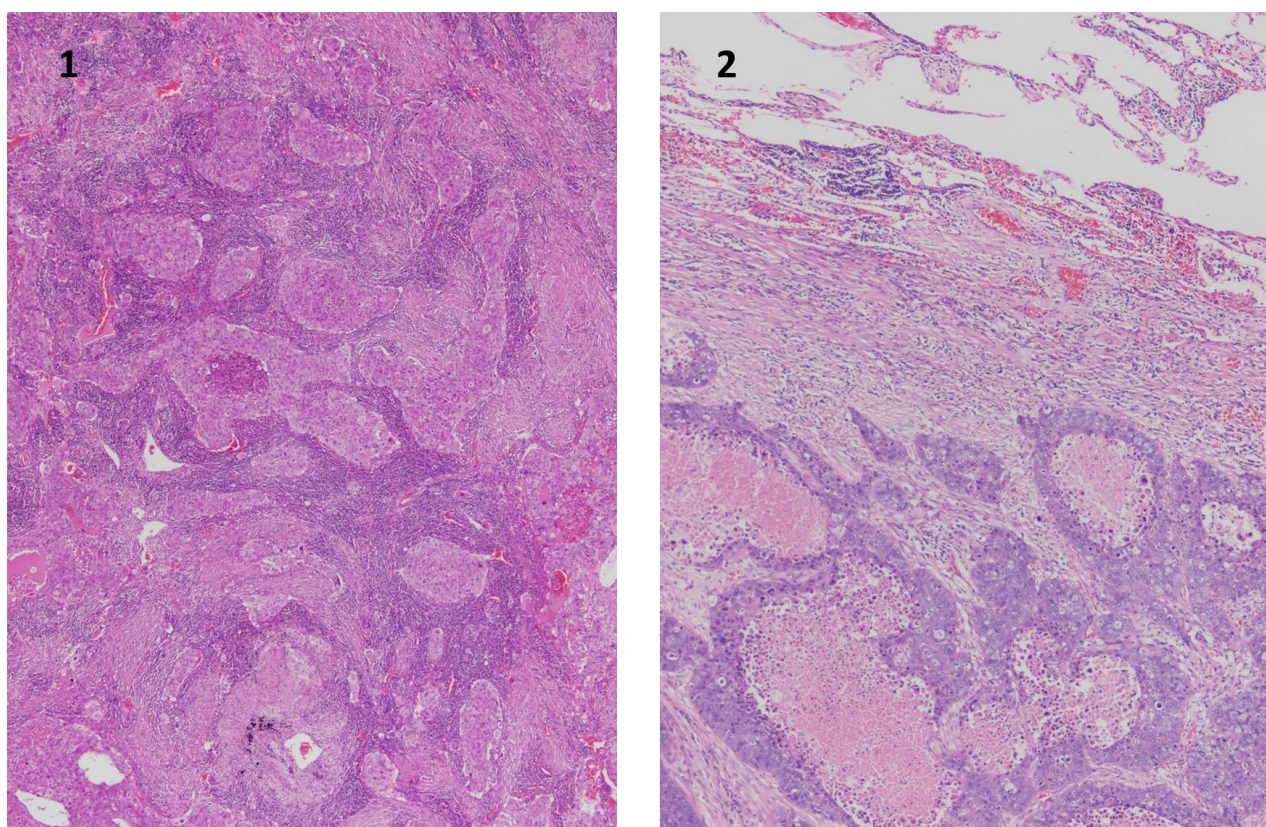
En resumen, en nuestra serie no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en TC ni en IC con la supervivencia (SLE ni SG) con ninguno de los clones.

### 4.3. Estudio del microambiente inmune tumoral (TILs) en CPNCP quirúrgicos.

#### 4.3.1. Análisis descriptivo.

Se ha estudiado el microambiente inmune, por un lado, con la valoración en la H-E siguiendo los criterios de Brambilla (**Brambilla et al. 2016**) y por otro, con el análisis automatizado de los linfocitos T CD8+ teñidos con IHQ.

La relación entre el infiltrado inflamatorio peritumoral, valorado con HE teniendo en cuenta los dos grupos (infiltrado inflamatorio intenso y no intenso) (**Figura 23**) y distintos datos clínico patológicos están reflejados en la **Tabla 20**.



**Figura 23.** Según criterios de Brambilla (**Brambilla et al. 2016**). 1. Infiltrado inflamatorio intenso. 2. Infiltrado inflamatorio no intenso. (H-E x 40).

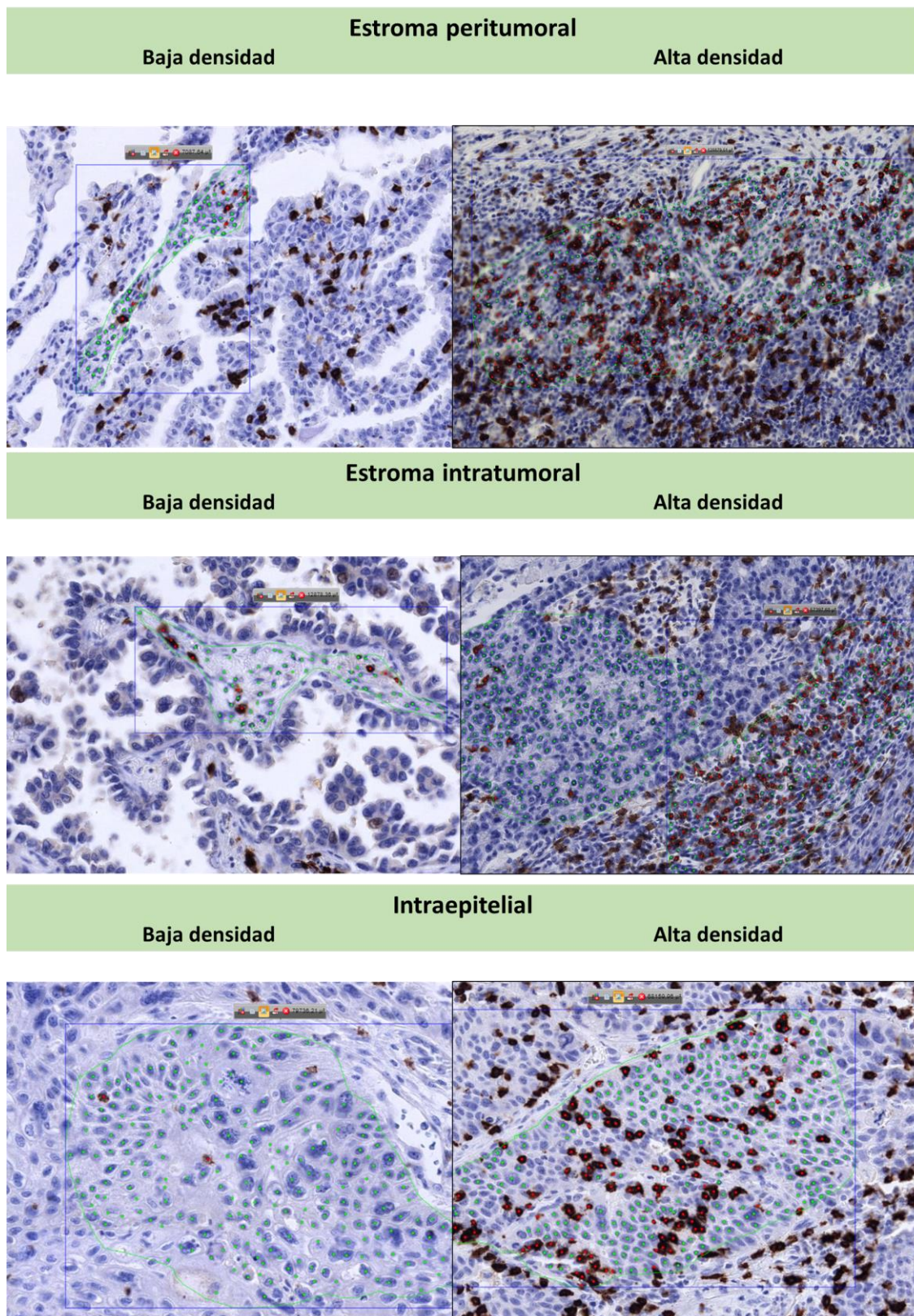
**Tabla 20.** Correlación entre la densidad de infiltrado inflamatorio peritumoral valorado con H-E y datos clínico-patológicos.

|                            | Infiltrado intenso        | Infiltrado no intenso |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <b>Total, n (%)</b>        | <b>41 (77,35)</b>         | <b>12 (22,64)</b>     |
| <b>Hábito tabáquico</b>    |                           |                       |
| Fumador                    | 17 (41,46)                | 4 (33,33)             |
| Exfumador                  | 17 (41,46)                | 6 (50)                |
| No fumador                 | 6 (14,63)                 | 2 (16,66)             |
| Desconocido                | 1 (2,43)                  | 0 (0)                 |
| <b>Subtipo histológico</b> |                           |                       |
| AD                         | 18 (43,90)                | 8 (66,66)             |
| C.E.                       | 22 (53,65)                | 4 (33,33)             |
| C.AE.                      | 1 (2,43)                  | 0 (0)                 |
| <b>AD</b>                  |                           |                       |
| Mucinoso (5 total)         | 5 (27,77)                 | 0 (0)                 |
| No mucinoso (22 total)     | 14 (77,77)                | 8 (100)               |
| <b>Grado histológico</b>   |                           |                       |
| G1                         | 3 (7,31)                  | 0 (0)                 |
| G2                         | 16 (6 CE y 10 AD) (39,02) | 5 (AD) (41,66)        |
| G3                         | 21 (16 CE y 5 AD) (51,21) | 7 (3AD y 4CE) (58,33) |
| <b>PD-L1 (media)</b>       | 22,83                     | 27,58                 |
| <b>Recaída</b>             |                           |                       |
| Si                         | 18 (43,90)                | 4 (33,33)             |
| No                         | 23 (56,09)                | 8 (66,66)             |
| <b>Éxito</b>               |                           |                       |
| Si                         | 32 (78,04)                | 7 (58,33)             |
| No                         | 9 (21,95)                 | 5 (41,66)             |

H.T. Hábito Tabáquico; S.H. Subtipo Histológico; AC. Adenocarcinoma; C.E. Carcinoma Escamoso; C.AE. Carcinoma Adenoescamoso.

Por otro lado, vemos en la siguiente figura (**Figura 24**) ejemplos de tumores con densidad alta y baja de linfocitos T CD8 en los distintos compartimentos estudiados, valorados mediante técnica IHQ. Los compartimentos (intraepitelial, estroma intratumoral y peritumoral) corresponden a las áreas que se seleccionaron y valoraron según se describe en la sección de material y métodos de la valoración de los TIL mediante el sistema automatizado usado en el estudio.





**Figura 24.** Ejemplos de diferentes densidades de TILs CD8+, en los distintos compartimentos estudiados analizados de forma automatizada con la plataforma VENTANA iScan (Ventana Medical System) (x200).

Con respecto al estudio morfológico de los TIL con IHQ CD8 mediante método digital, los resultados más relevantes son los mostrados en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Datos de media, mediana, SD y valor mínimo y máximo de los valores absolutos y densidad de CD8.

| TILs                        | Media | Mediana | S.D.      | Valor mínimo | Valor máximo |
|-----------------------------|-------|---------|-----------|--------------|--------------|
| <b>Estroma peritumoral</b>  |       |         |           |              |              |
| Número de CD8+              | 89    | 74      | 64,86     | 7            | 351          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 2.453 | 1.728   | 2.905,316 | 159          | 21.451       |
| <b>Estroma intratumoral</b> |       |         |           |              |              |
| Número de CD8+              | 49    | 37      | 43,37     | 3            | 200          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 1.504 | 1.119   | 1.144,246 | 135          | 4.769        |
| <b>Intraepitelial</b>       |       |         |           |              |              |
| Número de CD8+              | 20    | 7       | 37,36     | 0            | 199          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 410   | 219     | 569,92    | 0            | 2853         |

S.D. Desviación Estándar.

Valorando por separado los casos de AD y CE estos son los datos relevantes con respecto al microambiente inmune CD8 (**Tabla 22**).

**Tabla 22.** Valores de CD8 según subtipos histológicos (media, mediana y SD de valores absolutos y densidad).

| TILs en AD                  | Media | Mediana | S.D.     | Valor mínimo | Valor máximo |
|-----------------------------|-------|---------|----------|--------------|--------------|
| <b>Estroma peritumoral</b>  |       |         |          |              |              |
| Número de CD8+              | 75    | 67      | 50,90    | 7            | 176          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 2.160 | 1.731   | 1157,14  | 485          | 4401         |
| <b>Estroma intratumoral</b> |       |         |          |              |              |
| Número de CD8+              | 59    | 46      | 50,12    | 3            | 200          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 1.789 | 1.395   | 1.312,51 | 440          | 4.769        |
| <b>Intraepitelial</b>       |       |         |          |              |              |
| Número de CD8+              | 13    | 6       | 16,11    | 0            | 72           |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 373   | 268     | 385,67   | 0            | 1547         |

| TILs en CE                  | Media | Mediana | S.D.    | Valor mínimo | Valor máximo |
|-----------------------------|-------|---------|---------|--------------|--------------|
| <b>Estroma peritumoral</b>  |       |         |         |              |              |
| Número de CD8+              | 106   | 94      | 73,77   | 22           | 351          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 2.812 | 1.771   | 3984,80 | 159          | 21.451       |
| <b>Estroma intratumoral</b> |       |         |         |              |              |
| Número de CD8+              | 40    | 25      | 34,71   | 3            | 129          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 1.189 | 949     | 888,42  | 135          | 3200         |
| <b>Intraepitelial</b>       |       |         |         |              |              |
| Número de CD8+              | 29    | 9       | 50,02   | 0            | 199          |
| CD8+/mm <sup>2</sup>        | 463   | 189     | 718,20  | 0            | 2853         |

#### 4.3.2. Estudio del valor pronóstico de los TILs.

Con respecto a la densidad del infiltrado inflamatorio (según criterios de Brambilla) podría haber evidencia de que los pacientes que tienen un infiltrado intenso van mejor que los que no lo tienen (ya que se encuentra en mayor proporción en los pacientes vivos que en los fallecidos), pero no se alcanzan los estándares de significación en SLE ( $p= 0,21$ ) ni en SG ( $p= 0,196$ ).

No se ha identificado una relación estadísticamente significativa de la densidad ni del valor absoluto de los linfocitos CD8+ valorados con IHQ en el sistema de visualización automatizado VENTANA iScan HT, en nuestra cohorte, en ninguno de los compartimentos estudiados, en SLE ni SG, aunque la densidad de CD8 en estroma peritumoral tiene valores próximos a la significación, como se detalla a continuación.

Estos son los datos en relación a la **supervivencia libre de enfermedad**: CD8 en estroma intratumoral ( $p = 0,74$ ), densidad de CD8 en estroma intratumoral ( $p = 0,26$ ), CD8 en estroma peritumoral ( $p = 0,75$ ), densidad de CD8 en estroma peritumoral ( $p = 0,608$ ), CD8 en localización intraepitelial ( $p = 0,96$ ) y densidad de CD8 en localización intraepitelial ( $p = 0,27$ ).

Los datos en relación a la **supervivencia global** son: CD8 en estroma intratumoral ( $p = 0,70$ ), densidad de CD8 en estroma intratumoral ( $p = 0,18$ ), CD8 en estroma peritumoral ( $p = 0,50$ ), densidad de CD8 en estroma peritumoral ( $p = 0,07$ ), CD8 en localización intraepitelial ( $p = 0,51$ ) y densidad de CD8 en localización intraepitelial ( $p = 0,94$ ).

Tampoco se ha observado en nuestra serie una relación estadísticamente significativa con SLE ni SG tomando como punto de corte la cifra de 242 linfocitos T CD8+ usada en otros trabajos (**Conde E et al, 2018**); en el global de casos, ni en los casos valorados por subtipos histológicos (AD de  $p = 0,73$  y en no AD de  $p = 0,59$ ).

En resumen, en nuestra serie no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre número absoluto ni densidad de los linfocitos T CD8+ y la supervivencia (SLE ni SG).

#### 4.4. Correlación de la expresión de PD-L1 con el contexto inmune (linfocitos T CD8).

La correlación entre la expresión proteica de PD-L1, se ha realizado teniendo en cuenta los puntos de corte usados en ensayos clínicos para células tumorales (mayor o igual al 50% TC con el clon 22C3) y para células inmune (mayor o igual al 10%).



En las siguientes tablas se reflejan los datos de valor de CD8+ y densidad de CD8 valorado con sistema automatizado y la expresión de los dos clones estudiados (22C3 y 28-8) valorados con el observador I.E. en TC (**Tabla 23**) y en IC (**Tabla 24**).

**Tabla 23.** Correlación entre expresión de PD-L1 en TC con ambos clones (22C3 y 28-8) valorado por observador I.E. y los CD8+ (valor absoluto y densidad).

| CD8+                          | 22C3 |      |      | 28-8 |      |      |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                               | <50% | ≥50% | p    | <50% | ≥50% | p    |
| <b>Total (53)</b>             | 39   | 14   |      | 39   | 14   |      |
| <b>TILs CD8+ automatizado</b> |      |      |      |      |      |      |
| <b>Estroma peritumoral</b>    |      |      |      |      |      |      |
| Número de CD8+ (media)        | 86   | 97   | 0,30 | 86   | 97   | 0,30 |
| CD8/mm2 (media)               | 2521 | 2265 | 0,58 | 2521 | 2265 | 0,59 |
| <b>Estroma intratumoral</b>   |      |      |      |      |      |      |
| Número de CD8+ (media)        | 45   | 61   | 0,51 | 45   | 61   | 0,51 |
| CD8/mm2 (media)               | 1421 | 1733 | 0,45 | 1421 | 1733 | 0,45 |
| <b>Intraepitelial</b>         |      |      |      |      |      |      |
| Número de CD8+ (media)        | 19   | 25   | 0,16 | 19   | 25   | 0,16 |
| CD8/mm2 (media)               | 406  | 420  | 0,61 | 406  | 420  | 0,61 |

No se ha visto correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en TC y el valor absoluto ni la densidad de CD8, en ninguno de los compartimentos estudiados.

Únicamente el número absoluto de CD8 en localización intraepitelial con ambos clones (22C3 y 28-8) muestra una tendencia a la relación, pero sin alcanzar valores estadísticamente significativa (**Tabla 23**).

Tampoco se ha visto relación estadísticamente significativa entre CD8 y expresión de PD-L1 en TC cuando se ha valorado únicamente en el subtipo histológico CE con el clon 22C3 en los distintos compartimentos: estroma peritumoral ( $p = 1,0$ ), densidad en estroma peritumoral ( $p = 0,5$ ), estroma intratumoral ( $p = 0,48$ ), densidad en estroma intratumoral ( $p = 0,91$ ), intraepitelial ( $p = 0,72$ ) y densidad intraepitelial ( $p = 0,58$ ).

Sin embargo, sí se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre el valor absoluto y la densidad de CD8, con la expresión proteica de PD-L1 en IC en estroma peritumoral e intraepitelial, tanto con el clon 22C3 como con el 28-8. Pero no se ha visto relación significativa entre CD8 y PD-L1 en IC en el compartimento de estroma intratumoral, con ninguno de los dos clones. (**Tabla 24**)

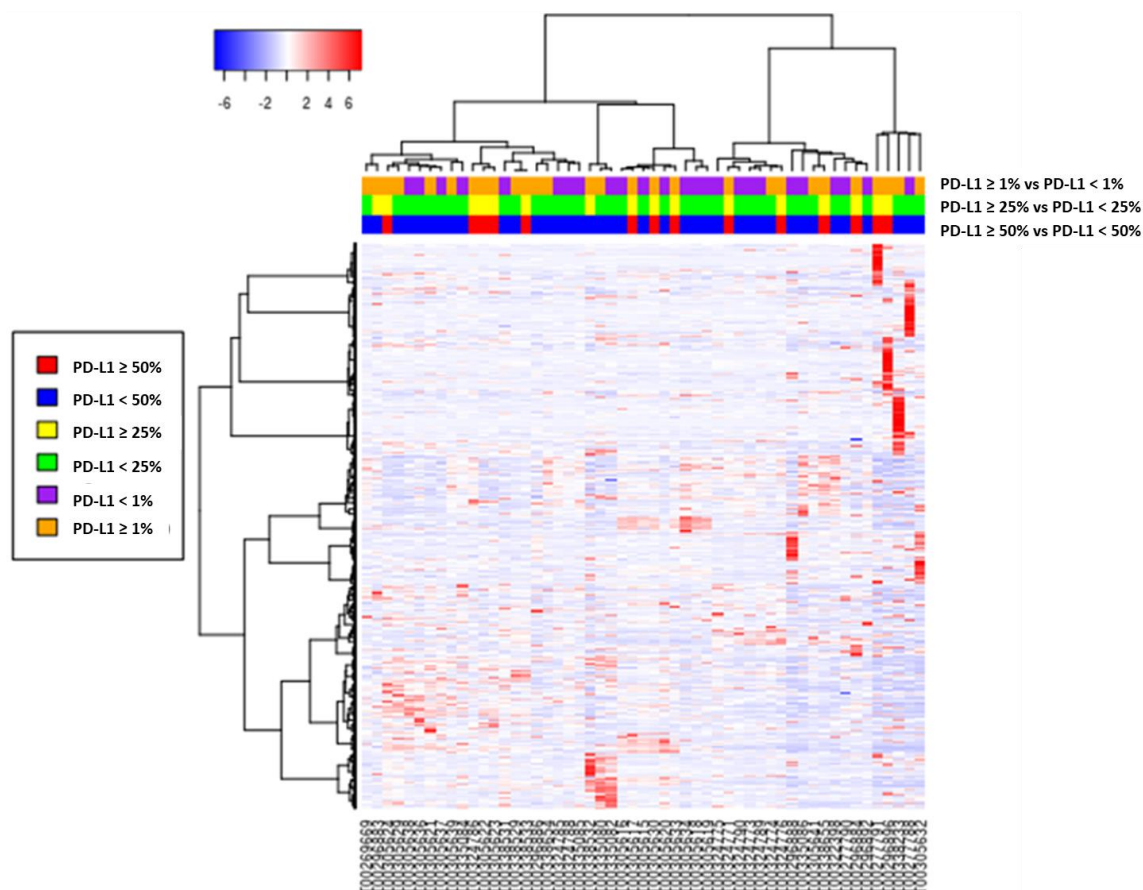
**Tabla 24.** Correlación entre expresión de PD-L1 en IC con ambos clones (22C3 y 28-8) valorado por observador I.E. y los CD8+ (valor absoluto y densidad).

| CD8+                          | 22C3 |      |       | 28-8 |      |       |
|-------------------------------|------|------|-------|------|------|-------|
|                               | <10% | ≥10% | p     | <10% | ≥10% | p     |
| <b>Total (53)</b>             | 44   | 9    |       | 43   | 10   |       |
| <b>TILs CD8+ automatizado</b> |      |      |       |      |      |       |
| <b>Estroma peritumoral</b>    |      |      |       |      |      |       |
| Número de CD8+ (media)        | 78   | 141  | 0,014 | 77   | 142  | 0,01  |
| CD8/mm2 (media)               | 1880 | 5256 | 0,001 | 1839 | 5096 | 0,001 |
| <b>Estroma intratumoral</b>   |      |      |       |      |      |       |
| Número de CD8+ (media)        | 47   | 60   | 0,19  | 46   | 63   | 0,10  |
| CD8/mm2 (media)               | 1424 | 1892 | 0,16  | 1405 | 1926 | 0,88  |
| <b>Intraepitelial</b>         |      |      |       |      |      |       |
| Número de CD8+ (media)        | 16   | 43   | 0,03  | 15   | 43   | 0,01  |
| CD8/mm2 (media)               | 303  | 933  | 0,03  | 292  | 915  | 0,01  |

En resumen, encontramos asociación estadísticamente significativa entre el número absoluto y la densidad de CD8 en los compartimentos intraepitelial y estroma peritumoral, con la expresión proteica de PD-L1 en IC, con ambos clones.

#### 4.5. Correlación de la expresión de PD-L1 en TC con el contexto molecular (estudiado mediante microarrays de expresión génica):

Se ha estudiado el perfil de expresión de ARN agrupados por distintos grupos de expresión proteica de PD-L1 en TC con los puntos de corte del 50%, 25% y el 1%. Valorando la expresión de los 16.600 genes estudiados, en estos grupos (los casos con una expresión proteica de PD-L1 ≥ 50% frente a casos con < 50%, los de ≥25% y < 25% y los casos con expresión ≥ 1% frente a los casos con <1%) no hemos encontrado en nuestra serie una expresión significativamente diferencial (**Figura 25**).



**Figura 25.** Heatmap de la expresión de los 16600 genes estudiados frente a la expresión proteica de PD-L1 en los puntos de corte de 50, 25 y 1 %.

Sin embargo, cuando valoramos el grupo de **expresión de  $\geq 50\%$  frente a  $<50\%$**  en el subgrupo de tumores no G3 (aunque solo hay un caso con expresión  $\geq 50\%$  frente a 23 casos con expresión  $<50\%$ ) sí encontramos 35 genes significativamente diferencialmente expresados (*MECR*, *GNGT2*, *MYO6*, *STOM*, *FBN3*, *CDH23*, *PCP4*, *ERV3-1*, *BMX*, *SEC61G*, *LANCL2*, *AEBP1*, *GPR35*, *TMEM100*, *ARHGAP10*, *COX18*, *FLJ42393*, *ZNF559*, *SCN9A*, *NEO1*, *STXPB6*, *LINC02036*, *TNC*, *CCDC150*, *EEF1DP3*, *LINC01138*, *CDC25C*, *NHS*, *KBTBD12*, *FAM19A3*, *NUDCD3*, *FGFR10P*, *DCUN1D4*, *DKFZP58611420*, *ISL1*), es decir encontramos un perfil génico en los pacientes con histología no G3 (G1 y G2) y alta expresión proteica de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ). Todos los genes están sobreexpresados en las muestras con alta expresión de PD-L1 respecto a las muestras con niveles por debajo del 50%, salvo uno, el gen *GNGT2*.

Cuando valoramos los pacientes con alta expresión de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ) frente al resto, en estadio I y II, se identifican 1228 genes diferencialmente expresados significativamente en el grupo de estadio I (de los cuales 1.206 están sobreexpresados en los de alta expresión frente a baja y 22 inhibidos) y 1.149 en estadio II (de los cuales 99 están sobreexpresados y 1.050 inhibidos). De éstos, 77 genes son comunes a ambos grupos (estadio I y II) y de ellos, los que se sobreexpresan

en ambas condiciones son los genes: *ACTL6B*, *AKNAD1*, *BBOX1-AS1*, *FMR1-AS1*, *LINC00511*, *LOC102724814*, *LOC105378052*, *PARM1*, *PON2*, *RD3*, *SLC26A7* y *ZFYVE27*; y los que se encuentran inhibidos en ambos son: *ACSF3*, *DDX42*, *GID8*, *GSPT1*, *POLE4*, *POLR2B*, *TM4SF18* y *TRMT61A*.

Si valoramos el grupo de **expresión de PD-L1 ( $\geq 1\%$ ) frente a ausencia de expresión ( $<1\%$ )**, encontramos genes diferencialmente expresados de forma significativa. En los pacientes con grado histológico no G3 (G1 y G2) encontramos 7 genes (*AGPAT2*, *RNF144A*, *BAK1*, *DDX56*, *LANCL2*, *RAMP1* y *SCP2*), todos ellos sobreexpresados en los casos con expresión  $\geq 1\%$ . En los de estadio I encontramos 1211 genes significativamente diferencialmente expresados, 21 de ellos inhibidos y **1190 sobreexpresados** en el grupo de expresión  $\geq 1\%$ . En estadio II encontramos 1232 genes significativamente diferencialmente expresados, todos ellos inhibidos en el grupo de  $\geq 1\%$ . Común en el estadio I y II encontramos **7 genes comunes inhibidos significativamente** en el grupo de  $\geq 1\%$  (*DDX42*, *LPIN2*, *OSBPL2*, *OTOS*, *POLR2B*, *TRAPPC6A*, *TRMT61A* y *TRMT61A*).

Del resto de los análisis realizados cabe destacar que no hemos encontrado ningún perfil génico en los pacientes vivos frente a los éxitos, tampoco cuando analizamos los subgrupos de expresión de PD-L1 (50%, 25% y 1%); ni en los grupos histológicos AD frente a CE.

En resumen, no hemos encontrado un perfil de expresión génica significativamente diferencial asociado a la expresión de PD-L1 en los cortes del 1/25/50%, pero sí encontramos un perfil génico en el subgrupo de pacientes con grado histológico no G3 y en el subgrupo de estadio I y II, asociado a la alta expresión de PD-L1 ( $\geq 50\%$ ) y a la expresión de PD-L1  $\geq 1\%$ . Común a ambos (expresión  $\geq 1\%$  y  $\geq 50\%$ ) en estadio I y II, encontramos la inhibición del gen *POLR2B*.

#### **4.6. Caracterización molecular de los CPNCP quirúrgicos, mediante análisis de niveles de expresión génica con microarrays. Estudio del valor pronóstico añadido a las variables ya conocidas (clínico-patológicas, de expresión de PD-L1 y CD8).**

Inicialmente se ha estudiado la correlación entre la expresión génica (de los genes seleccionados con significación en SLE o SG) y la expresión de PD-L1 y el infiltrado linfocitario CD8 (densidad y número en los distintos compartimentos). Sólo hemos encontrado correlación estadísticamente significativa con los linfocitos CD8. Entre el gen *MYOD1* y el nº de CD8 en estroma intratumoral ( $p=0,006$ ), *GSTA3* y la densidad de CD8 en estroma intratumoral ( $p=0,025$ ), *CDH7* y el número de CD8 en estroma peritumoral ( $p=0,024$ ) y el gen *ZNRD1* y la densidad CD8 en estroma peritumoral ( $p=0,01$ ).

Por otro lado, se ha estudiado la relación de la expresión de ARN de los genes habituales ya conocidos (*EGFR*, *ALK* y *ROS1*) y de PD-L1 con la SLE y la SG.

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa en **SLE** con la expresión de ARN de *EGFR* ( $p=0,004$ ; HR: 1,105; IdC del 95%: 1,033-1,181) y de *PD-L1* ( $p=0,027$ ; HR: 1,646; IdC del 95%: 1,057-2,563); pero no con *ALK* ( $p=0,57$ ) ni *ROS1* ( $p=0,29$ ).

Sin embargo, en relación a la supervivencia global, sólo *EGFR* es estadísticamente significativo ( $p=0,015$ ; HR: 1,08; IdC: 1,015-1,149). El resto no tienen significación estadística, *PD-L1* ( $p=0,25$ ), *ALK* ( $p=0,41$ ) y *ROS1* ( $p=0,34$ ).

Mediante un modelo de regresión de COX multivariante, tomando como grupo de referencia el AD no micropapilar, encontramos como otros factores predictivos independientes de recaída (**SLE**) los siguientes factores reflejados en la **Tabla 25**, siendo de riesgo AD micropapilar, no AD, la expresión de ARN de *EGFR* y *PD-L1* y factor de protección la expresión proteica de PD-L1 en IC valorado con el clon 28-8. La capacidad predictiva de este modelo, medida mediante el índice de Harrell (C-index) es de 0,76 y corregido por el exceso de ajuste por técnicas de “bootstrap” podría estimarse en 0,716.

**Tabla 25.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, obtenidos de un modelo de COX multivariante con los datos clínico-patológicos, de expresión de PD-L1 y CD8.

| Variable                            | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------------|------|-------|---------|-------|
| <b>AD no micropapilar</b>           | 1    | -     | -       | -     |
| <b>AD micropapilar</b>              | 3,59 | 0,058 | 0,95    | 13,53 |
| <b>No AD</b>                        | 4,39 | 0,013 | 1,37    | 14,09 |
| <b>PD-L1 en IC con el clon 28-8</b> | 0,80 | 0,009 | 0,68    | 0,95  |
| <b>Expresión de ARN de EGFR</b>     | 1,18 | 0,001 | 1,07    | 1,31  |
| <b>Expresión de ARN de PD-L1</b>    | 1,63 | 0,031 | 1,05    | 2,53  |

Añadiendo a este modelo algunos de los genes estudiados, se observa que mejora la capacidad de predicción de SLE. Así, añadiendo el gen *CDH7* se alcanza un índice de Harrell de 0,82, aunque pierde significación la expresión de ARN de PD-L1 (**Tabla 26**); con el gen *WDR26* se alcanza índice de Harrell de 0,82, aunque pierde significación el subtipo histológico no AD (**Tabla 27**), con el gen *UBXN11* se alcanza índice de Harrell de 0,81 (**Tabla 28**) y con el gen *ADIPOR1*, se alcanza un índice de Harrell de 0,81, aunque pierde significación la expresión de

ARN de PD-L1 (**Tabla 29**). Siendo factores de riesgo el gen *CDH7* (a mayor expresión peor SLE, ajustados por los demás factores de riesgo) y factores protectores los genes *WDR26*, *UBXN11* y *ADIPOR1* (receptor de adiponectina 1) (a mayor expresión mejor SLE, ajustados por los demás factores de riesgo).

**Tabla 26.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen *CDH7*.

| Variable                            | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------------|------|-------|---------|-------|
| <b>AD no micropapilar</b>           | 1    | -     | -       | -     |
| <b>AD micropapilar</b>              | 3,63 | 0,033 | 1,11    | 11,88 |
| <b>No AD</b>                        | 3,80 | 0,051 | 0,99    | 14,49 |
| <b>PD-L1 en IC con el clon 28-8</b> | 0,72 | 0,004 | 0,58    | 0,90  |
| <b>Expresión de EGFR ARN</b>        | 1,18 | 0,003 | 1,06    | 1,31  |
| <b>Expresión de PD-L1 ARN</b>       | 1,5  | 0,144 | 0,91    | 2,47  |
| <b>Expresión de CDH7 ARN</b>        | 1,93 | 0,002 | 1,26    | 2,95  |

**Tabla 27.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen *WDR26*.

| Variable                            | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------------|------|-------|---------|-------|
| <b>AD no micropapilar</b>           | 1    | -     | -       | -     |
| <b>AD micropapilar</b>              | 4,09 | 0,02  | 1,25    | 13,35 |
| <b>No AD</b>                        | 2,80 | 0,13  | 0,73    | 10,79 |
| <b>PD-L1 en IC con el clon 28-8</b> | 0,78 | 0,006 | 0,66    | 0,93  |
| <b>Expresión de EGFR ARN</b>        | 1,16 | 0,005 | 1,05    | 1,30  |
| <b>Expresión de PD-L1 ARN</b>       | 1,61 | 0,044 | 1,01    | 2,56  |
| <b>Expresión de WDR26 ARN</b>       | 0,67 | 0,017 | 0,48    | 0,93  |

**Tabla 28.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen *UBXN11*.

| Variable                            | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------------|------|-------|---------|-------|
| <b>AD no micropapilar</b>           | 1    | -     | -       | -     |
| <b>AD micropapilar</b>              | 5,29 | 0,007 | 1,56    | 17,92 |
| <b>No AD</b>                        | 5,14 | 0,021 | 1,28    | 20,62 |
| <b>PD-L1 en IC con el clon 28-8</b> | 0,78 | 0,006 | 0,66    | 0,93  |
| <b>Expresión de EGFR ARN</b>        | 1,13 | 0,022 | 1,02    | 1,25  |
| <b>Expresión de PD-L1 ARN</b>       | 1,54 | 0,049 | 1,002   | 2,38  |
| <b>Expresión de UBXN11 ARN</b>      | 0,91 | 0,011 | 0,85    | 0,98  |

**Tabla 29.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen *ADIPOR1*.

| Variable                            | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------------|------|-------|---------|-------|
| <b>AD no micropapilar</b>           | 1    | -     | -       | -     |
| <b>AD micropapilar</b>              | 6,45 | 0,003 | 1,87    | 22,22 |
| <b>No AD</b>                        | 4,59 | 0,03  | 1,15    | 18,31 |
| <b>PD-L1 en IC con el clon 28-8</b> | 0,81 | 0,022 | 0,68    | 0,97  |
| <b>Expresión de EGFR ARN</b>        | 1,14 | 0,01  | 1,03    | 1,26  |
| <b>Expresión de PD-L1 ARN</b>       | 1,51 | 0,144 | 0,89    | 2,25  |
| <b>Expresión de ADIPOR1 ARN</b>     | 0,96 | 0,013 | 0,93    | 0,99  |

Con respecto a los valores en relación a **supervivencia global**, encontramos también mediante un modelo de regresión de COX multivariante, tomando como grupo de referencia pacientes no fumadores, como factores predictivos de **SG** los siguientes reflejados en la **Tabla 30**. Siendo factor de riesgo el hábito tabáquico, el porcentaje de ganglios positivos y la densidad de CD8 en estroma peritumoral y protector la densidad de linfocitos CD8+ en estroma intratumoral

(EIT). La capacidad predictiva de este modelo, medida mediante el índice de Harrell (C-index) es de 0,68 y corregido por el optimismo de 0,64.

**Tabla 30.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, obtenidos de un modelo de COX multivariante con los datos clínico-patológicos, de expresión de PD-L1 y CD8.

| Variable            | HR   | p    | IdC 95% |       |
|---------------------|------|------|---------|-------|
| No fumador          | 1    | -    | -       | -     |
| Fumador             | 5,61 | 0,03 | 1,20    | 26,28 |
| Exfumador           | 6,71 | 0,01 | 1,53    | 29,40 |
| % GL positivos      | 1,02 | 0,02 | 1,00    | 1,04  |
| Densidad CD8 en EIT | 0,99 | 0,09 | 1,00    | 1,00  |
| Densidad CD8 en EPT | 1,00 | 0,03 | 1,00    | 1,00  |

Añadiendo a este modelo algunos de los genes estudiados, se observa que mejora la capacidad de predicción de SG. Así añadiendo el gen *NGDN* el índice de Harrell es de 0,76 aunque pierden significación los linfocitos T CD8+ tanto en EPT como en EIT (**Tabla 31**). Añadiendo el gen *MYOD1* el índice de Harrell es de 0,74 aunque pierden significación los CD8 en EIT y la proporción de GL positivos (**Tabla 32**); con el gen *ADCYAP1R1* el índice de Harrell es de 0,73 pero pierden significación también los CD8 en EIT y EPT (**Tabla 33**); y con el gen *CCL17* el índice de Harrell es de 0,73 y pierden significación los CD8 en EIT y el estatus fumador (**Tabla 34**). La mayor parte de estos genes (*MYOD1*, *ADCYAP1R1* y *CCL17*) son factores protectores (a mayor expresión mejor SG, ajustados por los demás factores de riesgo) y sólo el gen *NGDN*, es factor de riesgo (a mayor expresión menor SG, ajustados por los demás factores de riesgo).

**Tabla 31.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen *NGDN*.

| Variable                     | HR    | p     | IdC 95% |       |
|------------------------------|-------|-------|---------|-------|
| No fumador                   | 1     | -     | -       | -     |
| Fumador                      | 8,77  | 0,01  | 1,66    | 46,23 |
| Exfumador                    | 10,12 | 0,004 | 2,05    | 49,93 |
| % GL positivos               | 1,03  | 0,005 | 1,01    | 1,05  |
| Densidad CD8 en EIT          | 0,99  | 0,23  | 0,99    | 1,00  |
| Densidad CD8 en EPT          | 1,00  | 0,21  | 0,99    | 1,00  |
| Expresión ARN de <i>NGDN</i> | 1,68  | 0,00  | 1,33    | 2,13  |



**Tabla 32.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen *MYOD1*.

| Variable                      | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------|------|-------|---------|-------|
| No fumador                    | 1    | -     | -       | -     |
| Fumador                       | 5,54 | 0,03  | 1,18    | 26,00 |
| Exfumador                     | 6,01 | 0,017 | 1,94    | 41,34 |
| % GL positivos                | 1,02 | 0,076 | 1,01    | 1,05  |
| Densidad CD8 en EIT           | 0,99 | 0,126 | 1,00    | 1,00  |
| Densidad CD8 en EPT           | 1,00 | 0,044 | 1,00    | 1,00  |
| Expresión ARN de <i>MYOD1</i> | 0,99 | 0,05  | 1,32    | 2,11  |

**Tabla 33.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen *ADCYAP1R1*.

| Variable                          | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-----------------------------------|------|-------|---------|-------|
| No fumador                        | 1    | -     | -       | -     |
| Fumador                           | 7,38 | 0,007 | 1,73    | 31,53 |
| Exfumador                         | 5,84 | 0,012 | 1,47    | 23,23 |
| % GL positivos                    | 1,02 | 0,042 | 1,00    | 1,04  |
| Densidad CD8 en EIT               | 0,99 | 0,113 | 1,00    | 1,00  |
| Densidad CD8 en EPT               | 1,00 | 0,082 | 1,00    | 1,00  |
| Expresión ARN de <i>ADCYAP1R1</i> | 0,64 | 0,01  | 0,45    | 0,90  |

**Tabla 34.** Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen *CCL17*.

| Variable                      | HR   | p     | IdC 95% |       |
|-------------------------------|------|-------|---------|-------|
| No fumador                    | 1    | -     | -       | -     |
| Fumador                       | 3,28 | 0,072 | 0,90    | 11,98 |
| Exfumador                     | 3,79 | 0,034 | 1,11    | 13,02 |
| % GL positivos                | 1,04 | 0,00  | 1,02    | 1,06  |
| Densidad CD8 en EIT           | 0,99 | 0,24  | 1,00    | 1,00  |
| Densidad CD8 en EPT           | 1,00 | 0,004 | 1,00    | 1,00  |
| Expresión ARN de <i>CCL17</i> | 0,92 | 0,042 | 0,85    | 0,99  |

En resumen, hemos encontrado un modelo con buena capacidad predictiva de SLE con las variables subtipo histológico + expresión de PD-L1 en IC con el clon 28-8 + expresión de ARN de *EGFR* y *PD-L1*. Este modelo mejora añadiendo la expresión de ARN de *CDH7*, *WDR26*, *UBXN11* y *ADIPOR1*. Así mismo también encontramos un modelo con buena capacidad predictiva de SG con las variables hábito tabáquico + porcentaje de GL positivos + densidad de CD8 en EIT + densidad de CD8 en EPT. Este modelo mejora añadiendo la expresión de ARN de *NGDN*, *MYOD1*, *ADCYAP1R1* y *CCL17*.

## **DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

La inmunoterapia se ha convertido en un tratamiento en expansión en distintos tumores y en especial en el **CPNCP**, ya sea en monoterapia o como combinación con quimioterapia estándar. Por ello hemos querido estudiar los biomarcadores relacionados con inmunoterapia, así como los hallazgos patológicos, en una serie con un largo seguimiento, superior a 10 años, en muestras de resecciones completas del tumor,

Con este objetivo, se han correlacionado los resultados obtenidos en nuestra serie con lo descrito en la literatura. Posteriormente se ha intentado buscar una combinación que pueda aportar una información adicional pronóstica, a la actualmente empleada.

Por tanto, a continuación, iremos discutiendo nuestros hallazgos, siguiendo el mismo orden que el de los resultados.

### 5.1. Variables histológicas y clínicas

Con respecto a los **hallazgos histológicos**, sólo hemos encontrado en nuestra serie que el subtipo histológico y el grado son factores con valor pronóstico. Los CE y los AD con componente micropapilar tiene peor pronóstico y en los tumores de grado G3 (definido como se describe en el epígrafe 3.2.2) de ambos tipos.

Estos datos son concordantes con lo descrito en la literatura, donde el subtipo micropapilar es un factor de mal pronóstico (**Yoshizawa et al. 2011**, **Warth et al. 2012**, **Travis et al. 2015**), incluso aunque solo corresponda a un 1% del total de los patrones (**Cha et al. 2014**). Otros autores también encuentran mayor recurrencia en resecciones segmentarias con un 5% de este componente (**Nitadori et al. 2013**) o mayor recurrencia en estadios I (**Kadota et al. 2014**).

También se incluye en parte de estos trabajos el subtipo sólido como factor de mal pronóstico (**Cha et al. 2014**) y de mayor frecuencia de N2 (junto al micropapilar) cuando es el patrón predominante (**Russell et al. 2013**). En nuestro estudio no hemos encontrado esta relación con el patrón sólido, aunque sí con el grado histológico G3, en el que está incluido dicho patrón.

De los **datos clínicos**, sólo encontramos en el análisis multivariante, el estatus no fumador como factor de pronóstico favorable en SG, al observar un aumento del riesgo en los pacientes fumadores y exfumadores frente a los no fumadores (HR de 5,61 a 6,71) con significación estadística ( $p=0,03$  y  $p=0,01$  respectivamente). Éste dato también es concordante con lo descrito en la literatura (**Travis et al. 2015**).

Sin embargo, otros factores descritos en la literatura como el tamaño tumoral ( $\geq 2,5$  cm peor pronóstico), la invasión vascular o el sexo (**Yoshizawa et al. 2011, Travis et al. 2015**) no han sido significativos en nuestra cohorte, probablemente debido al reducido tamaño muestral.

## 5.2. Expresión proteica de PD-L1

La expresión proteica de PD-L1 es uno de los biomarcadores que ha emergido para seleccionar pacientes para el tratamiento con inmunoterapia, aunque no es el biomarcador ideal debido a diferentes aspectos. Por un lado, por las características propias del marcador que tiene una expresión heterogénea y dinámica, y por otro por la gran variedad de anticuerpos y plataformas que existen para su determinación.

Esta heterogeneidad en los tumores dificulta la valoración del *score*, e influye en las diferencias que se pueden encontrar en la positividad o el porcentaje entre muestras pequeñas (biopsias o citología) y piezas quirúrgicas, o entre distintos cortes de una misma pieza quirúrgica en los que se realice la determinación. Algunos autores han estudiado estos aspectos, que vamos a discutir a continuación.

Los resultados de correlación entre biopsias y piezas son discrepantes. Ilie M et al, valoran la expresión con el clon SP142 en 160 pacientes y encuentran una pobre asociación en la valoración de TC e IC, con discordancia en el 48% de los casos (*Kappa*: 0,218) entre biopsias y sus correspondientes piezas quirúrgicas. Vieron que, en todos los casos la biopsia infraestimó el resultado y fue mayor la discrepancia en la valoración de IC (TC1/2/3 26% y IC1/2/3 en 74%) (**Ilie et al. 2016**). También, Gniadek TJ y col, evalúan 170 casos de piezas quirúrgicas (79 CE y 71 AD) y realizan *tissue microarrays* (4 muestras por tumor), usando el clon SP 142 y valorando únicamente TC. En este estudio vieron que el resultado fue heterogéneo entre los distintos cilindros del mismo tumor con una sensibilidad de alrededor del 85%. La sensibilidad de un único cilindro en la valoración de  $> 50\%$  de expresión de PD-L1 fue del 85% para AD y del 95% para CE. En la valoración de  $>1\%$ , fue del 87% para AD y del 90% para CE. Estos resultados podrían ser extrapolables al obtenido de biopsias pequeñas realizadas de distintas zonas de un mismo tumor (**Gniadek et al. 2017**). Sin embargo, Kitazono S et al, encuentran que hay una buena concordancia (del 92,4% con un *Kappa* de 0,836), usando un clon policlonal de ProSci, en 79 casos con biopsia y pieza quirúrgica pareadas (**Kitazono et al. 2015**).

En relación a la comparación entre distintos cortes de una misma pieza quirúrgica, Rehman y col, evaluaron en 35 resecciones de CPNCP, en 3 bloques distintos de un mismo tumor, la expresión de PD-L1 usando el clon SP142. Encontraron que fue similar la expresión en TC (CCI

del 94%), proponiendo así, que la valoración de una sola sección de una pieza es suficientemente representativa de la heterogeneidad espacial del tumor (**Rehman et al. 2017**).

También la expresión de PD-L1 puede ser dinámica a lo largo del tiempo, dependiendo de factores externos del microambiente como estímulos inflamatorios (por ejemplo el IFN Gamma) que pueden hacer que se exprese más PD-L1 (resistencia inmune adaptativa) (**Pardoll 2012**) o tratamientos previos. Por ejemplo, la RT (**Yang et al. 2018**) que puede aumentar su expresión o los tratamientos anti TKI que pueden disminuirla (**Chen et al. 2015**). También pueden cambiar tras la administración de inmunoterapia, como algunos autores han estudiado en el melanoma (**Vilain et al. 2017**). Por último, hay aspectos técnicos preanalíticos (tiempo de antigüedad, fijación, etc.), que también pueden influir en la expresión de PD-L1 (**Sica and Ramalingam 2017**).

Por otro lado, hay dificultades técnicas como son la gran **variedad de anticuerpos (clones)** usados para su determinación y de **plataformas** de inmunotinción asociadas a los clones, que suponen una dificultad añadida en la utilidad de PD-L1 como biomarcador y en su implementación en los servicios de anatomía patológica.

Sin embargo, la expresión de PD-L1 actualmente es el biomarcador usado en la práctica habitual, para la indicación de los fármacos inhibidores de los puntos de control PD1-PD-L1, ya sea de forma complementaria o acompañante, según las indicaciones de FDA o EMA por las que han sido aprobados. Además, el porcentaje que se considera positivo depende del fármaco y del tipo de indicación (ya sea en primera o segunda línea). El único fármaco en el que es obligatoria su determinación mediante IHQ en muestra tumoral es pembrolizumab cuando se usa en segunda línea o en primera línea en los casos con alta expresión de PD-L1. Para el resto de fármacos en el tratamiento de segunda línea (nivolumab, atezolizumab) no es obligatoria dicha determinación, sino complementaria. (**Novello et al. 2016, Hanna et al. 2017, Bironzo et al. 2018**).

Como se ha comentado en la introducción, en los ensayos clínicos, en los que se ha demostrado su valor predictivo de respuesta al tratamiento y a partir de los cuales se ha determinado su posterior aprobación FDA/EMA, se han usado distintos clones de PD-L1 (**Borghaei et al. 2015, Brahmer et al. 2015, Herbst et al. 2016, Reck et al. 2016, Rittmeyer et al. 2017**).

Esto ha llevado a la realización de varios estudios que valoran la concordancia entre los distintos clones, para ver si pueden ser intercambiables, los denominados estudios de armonización.

Hay estudios que valoran concordancia entre clones (intraobservador) (es decir, comprueban que tiñen las mismas células en % y por tanto se da el mismo score). En general, los estudios realizados hasta la fecha concluyen que es buena la concordancia a la hora de valorar



las TC, pero no las IC (índices *kappa* para TC entre 0,75 y 0,72; y 0,1-0,2 para IC). Por el contrario, el clon SP142 tiñe en menor proporción TC e IC (es menos sensible) y el clon 73-10 tiñe más TC e IC (es más sensible) y por tanto no son intercambiables con los anteriores (**Scheel et al. 2016, Buttner et al. 2017, Hirsch et al. 2017, Rimm et al. 2017, Tsao et al. 2017, Adam et al. 2018, Conde et al. 2018, Tsao et al. 2018**).

Los datos de nuestra serie son semejantes. También encontramos una buena concordancia entre la expresión tanto en TC como en IC entre los clones estudiados (22C3 y 28-8). La concordancia entre los clones 22C3 y 28-8, para la valoración de célula tumoral, valorado por el observador I.E. es buena con un coeficiente de correlación intraclase (CCI) del 0,99 (IdC 95%: 0,982-0,994;  $p < 0,001$ ); y para la valoración de las células inmunes el CCI es del 0,93 (IdC 95%: 0,870-0,956;  $p < 0,001$ ). Sin embargo, con el observador E.R., aunque la concordancia entre clones para la valoración de TC también es buena con un CCI del 0,95 (IdC 95%: 0,909-0,969;  $p < 0,001$ ), la valoración de las células inmunes tiene una baja correlación con un CCI de 0,249 (IdC 95%: -0,024-0,487;  $p = 0,037$ ), más acorde con los datos referidos en la literatura. Podría especularse que esto sea debido a que el observador I.E. realizó la valoración de ambos clones de forma consecutiva, valorando en cada caso ambos clones a la vez, y el observador E.R. lo realizó de forma independiente en días separados, siendo probablemente una valoración más objetiva e independiente.

Por otro lado, también se ha estudiado la concordancia entre patólogos (interobservador) con el mismo clon, para ver que es reproducible la valoración (el *score*). En varios de los estudios anteriormente mencionados se ha visto esta correlación encontrando buenos índices de concordancia con todos los clones estudiados (22C3, 28-8, SP263, SP142 y 73-10) en TC (**Buttner et al. 2017, Rimm et al. 2017, Tsao et al. 2018**). En el estudio más reciente, el estudio Blueprint fase 2, los índices de correlación intraclase con los 5 clones estudiados son buenos para TC (entre 0,88 y 0,93) y son pobres para IC con índices de correlación intraclase entre 0,18-0,19. Por grupos, el índice *Kappa* para TC es  $>0,7$  especialmente en los puntos de corte  $\geq 5\%$ , 10%, 25% y 50%. Por el contrario, el índice *Kappa* por grupos en célula inflamatoria, IC0 ( $<1\%$ ), IC1 (1-4%), IC2 (5-9%) e IC3 ( $\geq 10$ ) es pobre con índices *Kappa* de 0,11 a 0,21.

En nuestra serie hemos comprobado lo mismo que se ha descrito en la literatura. La correlación entre distintos observadores para la valoración de las células tumorales es muy buena con ambos clones, valorando el *score* como un continuo. Siendo el CCI de 0,902 (IdC 95%: 0,836-0,942;  $p < 0,001$ ) para el clon 22C3 y de 0,927 (IdC 95%: 0,877-0,957;  $p < 0,001$ ) para el clon 28-8; y discreta en la valoración de la celularidad inmune, con un CCI de 0,413 (IdC 95%: 0,163-0,613;  $p = 0,001$ ) con el clon 22C3 y de 0,313 (IdC 95%: 0,053-0,534;  $p = 0,010$ ) con el clon 28-8.

Valorando por grupos de expresión de acuerdo con los valores usados en los ensayos clínicos (<1%/ 1-24%/ 25-49%/  $\geq$  50%), tenemos una concordancia discreta entre observadores para la valoración de TC con el clon 22C3, medida mediante el índice *kappa* que es de 0,68 ( $p < 0,01$ ). Éste índice, mejora cuando se agrupa en <1%/ 1-49%/  $\geq$  50% (índice *kappa* de 0,76;  $p < 0,01$ ) y más aún cuando comparamos los grupos de <50% y  $\geq$  50% (K: 0,86;  $p < 0,01$ ). Siendo este último un buen índice de correlación.

El valor de la expresión en IC por grupos (<1%/ 1-4%/ 5-9%/  $\geq$  50%) también tiene una concordancia pobre con un índice *kappa* de 0,18 ( $p < 0,01$ ).

Estos buenos resultados en la valoración de TC con ambos clones, a pesar de que una de las observadoras no estaba entrenada previamente en el clon 22C3, es un dato que apoya la buena concordancia entre ambos clones. Por tanto, puede indicar que son intercambiables y que probablemente el entrenamiento de los patólogos en uno de ellos es suficiente para poder valorar ambos. Por otro lado, el hecho de que ambas patólogas estaban entrenadas en clones que usan los cortes del 1% y 50% para tratamiento y no del 25%, puede que haya influido en una menor concordancia en este último grupo.

También es importante el análisis de los resultados de concordancia en los grupos de 1 al 49%, que se reflejan en el apartado 4.2.3. En este grupo hay una peor correlación entre patólogos. Los porcentajes de correlación son menores que los descritos en la literatura y esto puede ser debido a que en el clon usado en nuestra práctica habitual, el tramo de 1-49% es el que incluye una misma indicación de tratamiento y, probablemente, esto condicione de forma inconsciente un menor esfuerzo en la valoración de los porcentajes intermedios. Por otro lado, la concordancia con el punto del corte del 25% aunque es el mejor (entre el 40 y el 50%) no es bueno, en nuestra experiencia y, por tanto, creemos que podría influir esta peor reproducibilidad en la selección de los pacientes para el tratamiento con durvalumab (ya que es ese el corte usado en los ensayos clínicos con dicho fármaco).

Otra conclusión compartida con otros autores (**Brustugun et al. 2014, Cooper et al. 2017, Caminoa-Lizarralde 2018**) es que la mayor variabilidad en la interpretación de PD-L1 está más relacionada con la concordancia interobservador que con la diferencia entre los clones (sobre todo 22C3, 28-8 y SP263).

Otro aspecto a mencionar es el uso de distintos sistemas de visualización para cada clon. Los clones de Dako (22C3, 28-8 y 73-10) con el autoteñidor Dako Link-48; y los de Roche (SP263 y SP142) con el Ventana Benchmark Ultra. Aunque éste no es objeto de nuestro estudio, es otra de las dificultades de la implementación de este biomarcador. Se han realizado estudios de armonización en este aspecto, en los que encuentran unas buenas correlaciones adaptando los protocolos a otras plataformas (Leica, Dako, Ventana) en las que no están validados los

anticuerpos por las casas comerciales (**Neuman et al. 2016, Ilie et al. 2017, Roge et al. 2017**). No obstante, algunos autores consideran que es necesario una apropiada estandarización y programas de calidad externos para poder adaptar un anticuerpo que está estandarizado, para hacerlo en otra plataforma no validada por la casa comercial (**Buttner et al. 2017**).

Otro punto a valorar es la **prevalencia de expresión de PD-L1**. Gran parte de los estudios se han realizado sobre resecciones quirúrgicas, por tanto, en pacientes con estadios iniciales de cáncer de pulmón, que no son actualmente los subsidiarios de los tratamientos con fármacos inhibidores de los puntos de control PD1-PD-L1. Sin embargo, no hay tantos estudios de la prevalencia en biopsias (ya sean del tumor principal o de una metástasis) que son las muestras más frecuentes en los pacientes en estadios avanzados, que sí son los que se pueden beneficiar de estas terapias.

Por ejemplo, en los distintos ensayos clínicos, se hace referencia a la prevalencia. Valorando la expresión en TC, los casos negativos (con expresión <1%) varían según los ensayos entre el 32% en el estudio POPLAR con el clon SP142 (**Fehrenbacher et al. 2016**), 33,61% en el ensayo KEYNOTE 024 (**Reck et al. 2016**) y 39,2% en el ensayo KEYNOTE 001 (**Garon et al. 2015**) ambos con el clon 22C3. Los casos positivos de expresión débil (entre el 1 al 49%) son el 37,6% en el KEYNOTE 001 y 37,89 en el KEYNOTE 024. En el estudio POPLAR la distribución es la siguiente  $\geq 1\%$ : 11% y  $\geq 5\%$ : 17%. Y por último los casos positivos con alta expresión ( $\geq 50\%$ ) son el 23,2 y 28,48% en el KEYNOTE 010 y 024 respectivamente; y el 10% en el POPLAR. El único estudio que valora la expresión de PD-L1 en IC es el POPLAR, que encuentra la siguiente proporción: <1% IC0: 32%;  $\geq 1\%$  IC1: 30%;  $\geq 5\%$  IC2: 13%;  $\geq 10\%$  IC3: 6%.

Recientemente, sí se ha realizado un estudio multicéntrico global (estudio EXPRESS) para ver la prevalencia en el mundo real de la expresión de PD-L1 en CPCNP localmente avanzados o metastáticos (pacientes subsidiarios de tratamiento). En el estudio se han reclutado 2435 pacientes mayores de 18 años, que no habían recibido tratamiento previo, con estadio IIIB/IV confirmado histológicamente. La valoración de PD-L1 se hizo con el clon 22C3 en los centros de origen (no se valoró en un centro de referencia) en muestras con una antigüedad no mayor de 5 años. Se reclutaron los casos de 45 centros en 18 países de América, Asia y Europa (entre ellos nuestro centro con 50 casos). En este estudio se encuentra que la prevalencia en TC de expresión de PD-L1 es: <1% (48,4%), 1-49% (30%) y  $\geq 50\%$  (22%), siendo similar entre las distintas regiones geográficas y entre biopsias y resecciones quirúrgicas (aunque no fueron muestras pareadas del mismo paciente) (**Dietel M 2018**).

Los datos de nuestra práctica habitual en el HULP con 1059 casos valorados entre los años 2017 y 2018 con el clon 22C3 (430 casos propios y 629 externos como centro de referencia), de los cuales 598 son subtipo AD, 350 CE y 111 CPNCP NOS; valorados tanto en material de

biopsia (712) como de resecciones (246) y citologías (101) es de: <1%: 38%, 1-49%: 33,5% y  $\geq$  50%: 29% en TC.

En nuestro estudio hemos encontrado (valorados con el clon 22C3) una proporción semejante a la descrita en la literatura con: <1%: 47,2%, 1-49%: 26,4% y  $\geq$  50%: 26,4% en TC y también en IC: <1% IC0: 32,1%;  $\geq$ 1% IC1: 34%;  $\geq$  5% IC2: 17%;  $\geq$  10% IC3: 17%; éstos últimos según lo descrito en el estudio POPLAR (**Fehrenbacher et al. 2016**).

En resumen, como hemos encontrado una prevalencia semejante a la descrita en la literatura en nuestra cohorte, que corresponde a muestras de archivo antiguas (de más de 10 años), pensamos, que, en vista de nuestros resultados, con los controles adecuados y seleccionando los bloques bien conservados, puede ser un material adecuado para la determinación de este biomarcador. También encontramos en la literatura datos a favor de que las muestras de archivo son válidas, como en nuestro caso, para la determinación de PD-L1, aunque con periodos de antigüedad menor. Por ejemplo, en el estudio KEYNOTE 010 de Herbst y col., con muestras de algo más de 8 meses de antigüedad (**Herbst et al. 2016a, Herbst et al. 2016b**) en el estudio ATLANTIC en el que se vio que la concordancia entre muestras de archivo de menos de 3 años y de biopsias recientes era de un 76,2% (**Buttner et al. 2017**).

Con respecto a la **correlación entre hábito tabáquico y expresión de PD-L 1 en TC** hay distintos estudios que demuestran una fuerte correlación entre ambos. En el estudio EXPRESS encuentran un mayor porcentaje de alta expresión de PD-L1 ( $\geq$  50%) en exfumadores y fumadores activos (24,1% y 24,5% respectivamente) frente a un 18,1% en los no fumadores. En el estudio de tesis doctoral de la Dra. Caminoa encuentran una fuerte correlación entre el estatus de fumador activo y una mayor expresión media de PD-L1 (**Caminoa-Lizarralde 2018, Conde et al. 2018**). En nuestra cohorte se confirma también esa asociación entre tabaco (fumadores y exfumadores frente a no fumadores) y expresión de PD-L1 ( $p=0,048$  con el clon 22C3 y  $p=0,037$  con el 28-8) y una proporción semejante en el grupo de fuerte expresión ( $\geq$  50 %) en TC a la encontrada en el estudio EXPRESS. En nuestra serie un 28,57% en fumador activo, 34,78% en exfumadores y 0% en no fumadores con ambos clones valorados por observador IE. Con respecto a los **subtipos histológicos** el estudio EXPRESS no encuentra diferencias en el % de expresión en TC entre AD (<1%: 49,8%, 1-49%: 50,2% y  $\geq$  50%: 22%) y CE (<1%: 43,2%, 1-49%: 56,8% y  $\geq$  50%: 22,5%). Sólo hay una ligera mayor proporción de casos negativos en AD. Algo mayor es la proporción de negativos en AD en nuestra experiencia en los casos del HULP en TC entre AD (<1%: 42%, 1-49%: 30% y  $\geq$  50%: 28%) y CE (<1%: 31%, 1-49%: 42% y  $\geq$  50%: 27%). En nuestro estudio actual, aún es mayor esa proporción de AD con negatividad de PD-L1 (<1%: 57,69%, 1-49%: 19,23% y  $\geq$  50%: 23,07%) frente a CE (<1%: 34,61%, 1-49%: 34,61% y  $\geq$  50%: 30,76%) aunque, si se tiene en cuenta el hábito tabáquico, no encontramos apenas diferencias entre AD en los que hay

asociación con el tabaco y los CE. Sólo en los AD en pacientes no fumadores hay menor expresión de PD-L1 y, a nivel estadístico, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los subtipos histológicos.

Con respecto a la asociación entre expresión proteica de PD-L1 y el resto de variables hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en TC usando los puntos de corte de los ensayos (<1%-1-49%->50%) con ambos clones y el grado de diferenciación G3 ( $p=0,001$  con el clon 22C3 y de  $p < 0,001$  con el clon 28-8) (mayor expresión de PD-L1 en los casos G3). Otros autores también encuentran asociación con alto grado histológico en AD. Driver y col estudian 125 AD y 38 CE con el clon SP142 y consideran los tumores con expresión de PD-L1 (TC>1% o IC>1%) frente a ausencia de expresión. En este estudio definen G3 a los AD pobremente diferenciados y si son mixtos sólo consideran el de mayor grado. Sin embargo, no definen muy claramente a qué consideran mixtos y si asignan el de mayor grado teniendo en cuenta el porcentaje de los patrones como en nuestro caso (**Driver et al. 2017**). También Cooper y col encuentran relación entre alta expresión de PD-L1 y alto grado histológico, aunque tampoco especifican como asignan el grado G3 en los AD (**Cooper et al. 2015**), así como otros estudios y metaanálisis (**Wang et al. 2015**).

También hemos observado en nuestra cohorte asociación estadísticamente significativa con el estadio N. Vemos mayor expresión en los pacientes con mayor N, con  $p=0,013$  en el clon 22C3 y  $p=0,001$  con el clon 28-8. En la literatura encontramos un metaanálisis en el que también encuentran asociación entre la expresión de PD-L1 y el estadio N (**Petrelli et al. 2018**), aunque ellos ven una relación inversa entre los tumores PD-L1+ (expresión  $\geq 5\%$  de TC) y un menor riesgo de tener ganglios positivos (pN+).

Con respecto a la existencia de una **expresión heterogénea**, algunos autores como Conde y col encuentran en su serie que todos los casos tienen una expresión heterogénea (**Conde et al. 2018**), mientras que en nuestra serie solo la encontramos en un 39,62% de los casos. Aunque en la serie de Conde todos los casos son CE, nosotros sólo encontramos heterogeneidad en el 50% de los casos de CE, aunque sí en mayor proporción que en los AD, en los que se la encontramos en un 30% de los casos. Esto podría indicar, basado en nuestros resultados, que los criterios de definición de heterogeneidad no son muy reproducibles.

En relación al **valor pronóstico de la expresión de PD-L1**, algunos estudios han visto un mejor pronóstico con la positividad de PD-L1. Schmidt y col, en 321 pacientes encuentran una mejor SG en los CE (subgrupo con gran tamaño tumoral, GL positivos y que recibieron terapia adyuvante) con PD-L1 en TC positivo. Estudiaron arrays de tejido (TMA) recogiendo 3 cilindros de cada tumor, usando el clon de PD-L1 E1L3N de Cell Signaling y valorando los tumores como positivos si PD-L1 en TC era  $\geq 5\%$  con intensidad al menos moderada (**Schmidt et al. 2015**).

Otros autores como Cooper y col. estudian una serie de 681 pacientes con CPNCP en estadios iniciales resecaados, de entre los años 1990-2008, estudiados con el clon 22C3 también en TMA y seleccionando entre 3-6 cilindros de cada tumor primario. Encuentran que la expresión de PD-L1  $\geq 50\%$  en TC es del 7,4% y que hay una relación estadísticamente significativa con mejor pronóstico en SG. Pero en este estudio la prevalencia de alta expresión de PD-L1 está muy por debajo de los ensayos clínicos y estudios que hemos visto en la discusión de la prevalencia (entre 22% del estudio EXPRESS (**Dietel M 2018**) y 28,48 en el KEYNOTE 024 (**Reck et al. 2016**) y puede que esta diferencia sea debida a que el estudio se ha realizado con TMA y no con cortes histológicos completos. Por otro lado, llama la atención el alto porcentaje de tumores clasificados como carcinoma de células grande en su serie (16,24%) contrastando con las cifras descritas en la literatura entre 9,4-2,3% (**Travis et al. 2015**) y la agrupación de los casos en estadios I y II-III, sin especificar si se tratan de estadios IIIA o IIIB (**Cooper et al. 2015**).

Por otro lado, Sun y col en su estudio de 1070 pacientes con resección quirúrgica (664 AD, 299 CE, 58 Carcinoma de célula grande y 49 otros) con el clon 22C3, encuentran que la expresión de PD-L1 en AD y en estadios I se asocia con peor SG, aunque tras ajustar por tratamiento postcirugía (QT o RT) se observan que dejan de ser estadísticamente significativas esas asociaciones. También observan que en los estadios I y II la expresión de PD-L1 es menor que en estadios más avanzados (los estadios I y II tiene una expresión  $\geq 50\%$  del 3,7% y 6,7% respectivamente, mientras que en el estadio IIIA es del 10,5% y del 13,9% en IIIB y IV). De nuevo encontramos en este estudio una menor proporción de la descrita en los principales estudios de prevalencia que hemos referido ( $<1\%$ : 55,3%, 1-49%: 38,3% y  $\geq 50\%$ : 6,4%) (**Sun et al. 2016**). El grupo de Tsao y col estudian 982 pacientes con CPNCP resecaados, valorados con el clon E1L3N de Cell Signaling en cortes completos histológicos y tampoco encuentran que la expresión de PD-L1 sea un factor pronóstico en estadios iniciales en los distintos puntos de corte estudiados tanto en TC (1%-25%-50%) e IC (1%-10%-25%) (**Tsao et al. 2017**).

Por el contrario, en otros estudios y en metaanálisis recientes, se encuentra una relación de mal pronóstico con la expresión de PD-L1 tanto en tumores sólidos en general, como en el CPNCP de pulmón. En un **metaanálisis** que incluye el estudio de 3107 pacientes con **tumores sólidos** de 28 publicaciones, concluyen que la sobreexpresión de PD-L1 se asocia a una peor supervivencia global a los 3 años (HR = 2.43; IdC del 95%: 1.60- 3.70;  $p < 0.0001$ ) y a los 5 años (HR = 2.23; IdC del 95%: 1.40- 3.55;  $p = 0.0008$ ), aunque indican que depende del tipo de tumor y que son necesarios más estudios para ver el valor clínico en el pronóstico (**Wu et al. 2015**). Además, ven esta asociación con mal pronóstico en otros metaanálisis ya sea de tumores sólidos en general (**Xiang et al. 2017**) o en CPNCP de pulmón. En el estudio de Wang y col., se valoraron 1157 pacientes de un total de 6 estudios en CPNCP y encontraron asociación con mal pronóstico en los de alta expresión de PD-L1, aunque los estudios que analizaron usaron distintos puntos de



corte de positividad. En el estudio de Petrelli y col. se analizaron 52 estudios de CPNCP (la mayoría con resección quirúrgica), tomando como punto de corte la expresión de  $\geq 5\%$  en TC (un 38% de 5066 pacientes evaluados) y también encontraron que la expresión de PD-L1 era un factor de mal pronóstico (**Wang et al. 2015, Petrelli et al. 2018**). Ambos estudios remarcan entre otras cosas que una de sus limitaciones es la variabilidad en los métodos de determinación de PD-L1 y los puntos de cortes usados en las distintas series que analizan.

En la serie de Chan y col con 713 casos de CPCNP con resección quirúrgica entre los años 1995 a 2011, de los que realizan TMA con 3 cilindros por caso, valorados con los clones 22C3, 28-8, SP142 y SP263, encuentran una menor supervivencia en los AD con alta expresión ( $\geq 50\%$ ) con el clon 22C3 y permanece como un factor independiente tras el análisis multivariante (**Chan et al. 2018**).

En resumen, hay múltiples estudios en los que encuentran diferente valor pronóstico de la expresión de PD-L1 valorando diferentes tipos de muestra (TMA, biopsia o pieza quirúrgica), distintos clones y diferentes puntos de corte para realizar el análisis. Desde buen pronóstico (**Velcheti et al. 2014, Cooper et al. 2015, Lin et al. 2015, Schmidt et al. 2015**), a mal pronóstico (**Chen et al. 2012, Azuma et al. 2014, Zhang et al. 2014, Wang et al. 2015, Wu et al. 2015, Xiang et al. 2017, Chan et al. 2018, Petrelli et al. 2018**) o que no encuentran valor pronóstico (**Yang et al. 2014, Kim et al. 2015, Tang et al. 2015, Ameratunga et al. 2016, Sun et al. 2016, Schalper et al. 2017, Tsao et al. 2017, Caminoa-Lizarralde 2018**).

En nuestra serie, no vemos valor pronóstico de la expresión de PD-L1, ni una menor expresión con respecto a la mayoría de los estudios de prevalencia referidos anteriormente. Esto último puede explicarse porque en nuestro caso se han estudiado cortes completos del tumor y no TMA (a diferencia del estudio de Cooper). Con respecto a la supervivencia tampoco encontramos una relación estadísticamente significativa con SLE ni SG a diferencia de otros autores que también incluyen casos resecados (**Wang et al. 2015, Chan et al. 2018, Petrelli et al. 2018**) y de forma semejante a lo que observan otros autores (**Tsao et al. 2017, Caminoa-Lizarralde 2018**); lo que podría deberse en nuestra serie, al número limitado de casos.

### 5.3. Estudio del microambiente inmune tumoral:

Como hemos comentado en varias ocasiones en este trabajo, la célula efectora de los fármacos de inhibición de los puntos de control PD-1/PD-L1 son los linfocitos T y por tanto son parte importante de nuestro estudio. En el estudio actual hemos estudiado su relación con la expresión de PD-L1, su valor pronóstico y la relación con los distintos parámetros estudiados. En relación a este valor pronóstico, ya hay iniciativas internacionales que han propuesto un

“inmunoscore” a incorporar a la clasificación TNM (TNM-I) dados los datos acumulados en la literatura del impacto pronóstico del infiltrado inflamatorio en distintos tumores (**Galon et al. 2012**).

Como explicamos en la introducción, el infiltrado inflamatorio como parte del microambiente tumoral se ha estudiado y valorado en distintos aspectos y mediante distintos métodos. Por un lado, Brambilla y col estudian la densidad del infiltrado con técnicas habituales de H-E dividiendo solo en dos grupos (infiltrado intenso y no intenso) (**Brambilla et al. 2016**). Encuentran que entre el 6 al 11% de los casos estudiados (783 casos de la cohorte de descubrimiento y 763 casos de validación) tienen un intenso infiltrado inflamatorio, siendo un factor de buen pronóstico estadísticamente significativo (HR entre 0,56 a 0,45) en casos con CPNCP resecaados. En nuestra cohorte encontramos un mayor porcentaje de casos con intenso infiltrado (12 de 53 casos, un 22%) que en la serie de Brambilla y vemos una tendencia a mejor pronóstico porque hay un mayor porcentaje en los pacientes vivos, incluyendo los casos de grado histológico G3, pero no encontramos significación estadística, lo que podría deberse a la escasa cantidad de casos de la muestra.

Otros estudios valoran el microambiente inmune mediante la valoración inmunohistoquímica de linfocitos T fundamentalmente CD8+, como hemos realizado en el presente trabajo. Los estudios que han valorado el pronóstico son discrepantes. Algunos ven mejor pronóstico, pero otros no lo confirman. En gran parte de los estudios hay variabilidad en la valoración y el método de contabilizar los linfocitos. En vistas a conseguir un método más reproducible y objetivo, algunos estudios han usado sistemas automatizados de medición, como en nuestro caso.

En una revisión reciente Donnem y col, buscando un inmunoscore en CPNCP de pulmón resecaado, evalúan 15 estudios (**Donnem et al. 2016**). Incluyen distintas series que valoran tanto TMA como secciones completas y las células inmunes a estudio son variables (CD8, CD4, CD3 fundamentalmente), así como los métodos de valoración del componente inmune (métodos manuales o digitales), la localización (intraepitelial, estromal o combinación), los puntos de corte (incluso en los que realizan valoración digital) y los métodos estadísticos. Aun así, en conjunto encuentran que el candidato a marcador más adecuado es el linfocito T CD8, ya que los resultados en general señalan que un elevado número de TILs CD8+ es un factor pronóstico positivo. La excepción es un estudio muy homogéneo de Suzuki y col, que incluye exclusivamente AD estadio I (956 casos) valorados de forma manual, en el que no encuentran valor pronóstico (**Suzuki et al. 2013**).

Uno de estos estudios es el de Ruffini y col, que incluye 1290 pacientes con tumores pulmonares en los que evalúan en espécimen quirúrgico, los TIL definidos como CD8+ intraepiteliales (en los nidos tumorales). Consideraron TIL positivo si había  $\geq 20\%$  de células

positivas. Con estas premisas, vieron que eran más frecuentes los infiltrados en los CPNCP que en los neuroendocrinos (24 vs 5%) y que había una mejor supervivencia estadísticamente significativa en los CE, sobretodo en estadios iniciales (**Ruffini et al. 2009**). Otro de los incluidos en esta serie, es el estudio de Donnem con 797 casos estadios I-IIIa de CPNCP con TMA y evaluando la densidad de TILs CD8+. Valoran de forma manual el porcentaje de CD8 del total de células nucleadas del estroma y hacen los siguientes puntos de corte: 0= 0-5%; 1 (baja densidad) = 5-25%; 2(densidad intermedia) =25-50% y 3 (alta densidad) => 50%. Encuentran que la densidad estromal de TIL CD8 es un factor pronóstico independiente (a mayor densidad mayor SG y SLE) (**Donnem et al. 2015**).

Hay otros estudios que valoran este aspecto. Remark y col, revisan múltiples estudios de CPNCP y la asociación con densidad del componente inmune. Encuentran en la mayoría de los estudios que los altos niveles de CD3+, CD8+ o CD4+, se asocian a pronóstico favorable. En contraste, el impacto clínico de los linfocitos B, neutrófilos y las células NK no está bien esclarecido (**Remark et al. 2015**). También se encuentran varios metaanálisis con respecto a este tema (**Geng et al. 2015, Zeng et al. 2016**). El de Zeng y col, analizan 24 estudios con 7004 pacientes, de los cuales 18 estudios (con 5113 pacientes) valoran TIL CD8+ y encuentran que un alto nivel de linfocitos T CD8+ tenía un mejor pronóstico valorando SG (HR 0.91; p = 0.013) y recurrencia (HR 0.74; p = 0.001) (**Zeng et al. 2016**). El de Geng analiza 29 artículos, con 8600 pacientes y encuentran que altos niveles de CD8+ en el estroma y en los nidos tumorales asocian una mejor SG (HR = 0.76; IdC del 95%: 0.62-0.93; p= 0.006 y HR = 0.80; IdC del 95%: 0.67-0.96; p = 0.018, respectivamente) (**Geng et al. 2015**).

En nuestro estudio, en el que hemos valorado el microambiente inmune mediante densidad y número de linfocitos T CD8+, con un sistema automatizado digital y valorando los distintos compartimentos como previamente han realizado otros autores (**Donnem et al. 2015, Salgado et al. 2015, Conde et al. 2018**), no hemos encontrado, al contrario que la mayoría de estudios, relación con SLE ni SG estadísticamente significativa; incluido el estudio de Caminoa, en el que se ha valorado con el mismo sistema de visualización y usando los mismos criterios de valoración y en los mismos compartimentos. Tampoco usando los puntos de corte en los que en su serie encontraban mayor SG en estroma peritumoral de forma estadísticamente significativa (densidad > 242 de TIL CD8+ intraepiteliales), ni en el global de los casos de nuestra serie ni valorado por subtipos histológicos (AD p=0,73 y en no AD p=0,59). Tampoco ellos confirman los datos en la serie de validación que usan en su publicación (**Conde et al. 2018**). Esto puede ser debido en parte a que nuestra serie es de pequeño tamaño e incluye también AD, al contrario que la de Caminoa y Conde que es únicamente de CE. Nuestra observación estaría apoyada por la serie de Suzuki que hemos mencionado previamente, en la que tampoco encontraban valor pronóstico y era de AD (**Suzuki et al. 2013**). Por otro lado, hay que tener en cuenta que, aunque la medición

del nº de células CD8+ y la superficie del área a estudio se hace de forma automatizada, la selección del área a evaluar se realiza manualmente por el patólogo y esto podría ser un factor que influya en la reproducibilidad de dicha medición.

#### 5.4. Concordancia entre expresión de PD-L1 y microambiente inmune.

La relación entre expresión de PD-L1 y microambiente tumoral (TIL) es interesante para mejorar la selección de los pacientes a tratar con fármacos inhibidores de los puntos de control inmunes. Como hemos visto anteriormente, el biomarcador actualmente usado en la práctica clínica es la expresión de PD-L1 (ya sea valorado en el tumor o en el tumor y en el componente inmune asociado), pero no selecciona a todos los pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento, ni todos los pacientes seleccionados por expresión de PD-L1 responden. Por tanto, no es el biomarcador ideal. Por ello, se están estudiando otros biomarcadores o asociaciones de biomarcadores. Teng y col, valoran esta asociación, entre PD-L1 y CD8 y hace 4 subtipos de tumores en función de la positividad o no de estas dos variables (tipo I: tumores PD-L1 + y CD8+; tipo II: tumores PD-L1 - y CD8-; tipo III: tumores PD-L1 + y CD8- y tipo IV: tumores PD-L1 - y CD8+) (**Teng et al. 2015**). Y de acuerdo con estos 4 subtipos, Ock y col, intentan extrapolar estos datos valorando niveles de expresión de ARN de *PD-L1* y *CD8A* usando la base de datos de TCGA (The Cancer Genome Atlas) de varios tipos tumorales (analizaron 9677 muestras tumorales de 32 tipos de cáncer). También realizaron cuatro tipos de microambiente inmune tumoral (TMIT) con los valores medios de esas dos variables. Estos autores vieron que el tipo I (alta expresión de *PD-L1* y alta expresión de *CD8A*) se encontraba en el 34,6% de todos los tumores (siendo más alta la proporción en AD de pulmón (67,1%) y en carcinoma renal de células claras (64,8%)) y que tenían una mejor SG que los de tipo III (HR de 1,20; IdC 95%: 1,07-1,35; p=0,002). También encontraron que el TMIT-I se asociaba a una alta carga mutacional, amplificación de PD-L1 y a infección viral oncogénica (EBV/HPV). Concluyeron con este análisis integrado, que es importante la determinación de PD-L1 y TIL en los tumores a la hora de predecir los pacientes respondedores a los fármacos inhibidores de PD-1/PD-L1 (**Ock et al. 2016**).

En el trabajo de Caminoa, en una cohorte semejante a la nuestra con 40 casos pero solo de subtipo CE, encuentran una relación entre la presencia de abundantes TILs CD8+ intraepiteliales y una alta expresión de PD-L1 en TC (**Caminoa-Lizarralde 2018**). Datos semejantes a los que encuentran Uruga y col, en su serie de 109 casos de AD estadios II-III. Este grupo ve una relación estadísticamente significativa entre abundantes CD8 intratumorales y expresión de PD-L1 en TC (con el clon E1L3N) en los puntos de corte 1 y 5%, pero no significativa en el punto de corte de 50%. La valoración de los CD8 se realizó de forma manual semicuantitativa

con los siguientes puntos de corte: 0= < 1%; 1= ≥1-< 10%; 2=≥10-<50% y 3 => 50%; definiendo como TILs abundantes los grado 2-3 (**Uruga et al. 2017**).

En nuestra serie, solo hemos visto concordancia entre ambas variables con relación estadísticamente significativa, entre el valor absoluto y la densidad de CD8 y la expresión de PD-L1 en IC en estroma peritumoral e intraepitelial, con ambos clones (22C3 y 28-8). Pero no se ha visto relación significativa en el compartimento de estroma intratumoral, con ninguno de los dos clones. Tampoco hemos visto asociación entre CD8 (en ninguno de los compartimentos) y la expresión de TC (con ninguno de los clones), a diferencia de lo que encuentran los autores anteriores.

Como hemos comentado en el apartado de valor pronóstico de los CD8, esto puede deberse en parte, al pequeño tamaño de la muestra, y a la posible falta de reproducibilidad en la selección de los campos (dependiente del observador), a la falta de criterios para la realización de la medición automatizada bien definidos de qué zonas se deben seleccionar, si de mayor intensidad o de densidad media (como hemos realizado en nuestro estudio y en el de Caminoa). Por último, también a la falta de puntos de corte definidos como alta o baja densidad (que es variable según los estudios, como hemos comentado en este punto y en el anterior) (**Ruffini et al. 2009, Donnem et al. 2015, Uruga et al. 2017, Conde et al. 2018**).

#### 5.5. Contexto molecular y su concordancia con la expresión de PD-L1 y el microambiente inmune.

Hemos comentado previamente algún estudio en el que se valora la expresión génica (expresión de ARN, la carga mutacional, etc) en CPNCP en relación a PD-L1 y microambiente (Ock CY, 2016). También hay estudios valorando las distintas alteraciones génicas en CPNCP en AD y en CE (**Campbell et al. 2016**); Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; (**Choi et al. 2017, Kadara et al. 2017**), además de las alteraciones frecuentes ya conocidas (**Rosell et al. 2016**). El “Cancer Genome Atlas Research Network” estudia el perfil molecular de 230 AD de pulmón resecaos usando ARN mensajero, microARN, secuenciación de ADN y metilación, y encuentran altas tasas de mutaciones somáticas y 18 genes significativamente mutados incluyendo las mutaciones activadoras de *RIT1* y las mutaciones de *MGA* de pérdida de función. Las aberraciones de *NF1*, *MET*, *ERB2* y *RIT1* se dieron en el 13% de los casos. En otro estudio de 108 casos de CE estadio I-III, Choi y col, estudian el genoma completo (WES) y mutaciones, usando la plataforma Illumina HiSeq 2000. Encuentran 14 genes mutados (*TP53*, *MLL2*, *PIK3CA*, *NFE2L2*, *CDH8*, *KEAP1*, *PTEN*, *ADCY8*, *PTPRT*, *CALCR*, *GRM8*, *FBXW7*, *RB1* y *CDKN2A*). Además, las mutaciones en los genes *ADCY8* and *PIK3CA* vieron que se asociaban con una baja expresión de PD-L1 en el tumor (**Choi et al. 2017**). En otro estudio del mismo grupo, realizan la

secuenciación del genoma completo con la misma plataforma, en 108 casos de estadio inicial (I-III) y subtipo histológico AD. Estudian además mediante IHQ la expresión de PD-L1, PD-1, CD3, CD4, CD8, CD45ro, CD57, CD68, FOXP3 y Granzyme B en un subgrupo de 92 casos. Vieron 28 genes con mutaciones significativas y encontraron diversas relaciones. Las mutaciones de *STK11* tenían niveles relativamente bajos de infiltrados de células T CD4+ / CD8+ y la expresión de PD-L1 estaba elevada en los AD con mutación de *TP53* y baja en los que tenían mutación de *PIK3CA*. Los que tenían mutaciones de *TP53* o *KEAP1*, mostraron niveles relativamente elevados de CD57 y Granzyme B indicativo del aumento de infiltrados NK (**Kadara et al. 2017**).

En nuestro estudio, del análisis de expresión de ARN realizado, hemos intentado correlacionar los genes estudiados con la expresión proteica de PD-L1. De los genes que hemos visto que están significativamente diferencialmente expresados en los distintos grupos analizados (como detallamos en el apartado 4.5 de resultados), hemos encontrado referencias en la literatura en relación al cáncer de pulmón, que pasamos a detallar.

De los **genes** que encontramos **asociados con** el grupo de pacientes con **alta expresión proteica de PD-L1 y grado histológico no G3**, encontramos con respecto al gen *BMX* que Wang Y. y col encuentran una variante de *BMX* asociada a proliferación, transformación neoplásica y migración de las células de CPNCP (**Wang et al. 2017**). También hemos encontrado estudios en los que han visto sobreexpresión del gen *GPR35* en los tejidos de CPNCP y correlación con mal pronóstico y quimioresistencia (**Wang et al. 2018**). La baja expresión de *TMEM100* se ha asociado en el estudio de Han y col, con mal pronóstico en CPCNP, debido al efecto inhibitor que tiene su sobreexpresión, en las células tumorales, medido por la supresión de la vía de señalización de TNF (**Han et al. 2017**). Teng y col, encuentran menores niveles de expresión de RNA de *ARHGAP10* en tejido tumoral que en parénquima normal. Sugieren que puede ser una proteína supresora tumoral en el cáncer de pulmón mediante la afectación de la vía de señalización Wnt (**Teng et al. 2017**). Wang y col encuentran una baja expresión de *STXBP6* en tejido tumoral de AD de pulmón probablemente mediante la hiperventilación del gen (**Wang et al. 2018**). Altos niveles de expresión de *FGFR1OP* se han encontrado en cáncer de pulmón y se han relacionado con mal pronóstico (**Mano et al. 2007**). Más recientemente, un metaanálisis con una muestra de 12160 casos de CPCNP encuentran que polimorfismos en el gen *FGFR1OP* se asocian con el riesgo de cáncer de pulmón (aumentándolo o disminuyéndolo según el polimorfismo) (**Kang et al. 2016**).

Dentro del grupo de **genes** que vemos **asociados con** los pacientes que combinan **alta expresión proteica de PD-L1 y estadio I-II**, hemos encontrado algunas referencias en la literatura con dos de los genes (*GSPT1* y *POLE4*) relacionados con el cáncer de pulmón. En relación al gen *GSPT1* se encuentra que la modulación del mismo por nicotina o el factor de



crecimiento epidérmico (EGF) promueve la invasión, proliferación y migración de células tumorales de CPCNP (**Nair et al. 2014**). El gen *POLE* (polimerasa DNA épsilon) ha sido bien estudiado en el cáncer endometrial. Incluso se incluyen sus mutaciones, junto a la inestabilidad de microsatélites y la mutación de p53, en una nueva clasificación molecular llamada ProMisE (Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer) con valor pronóstico (**Talhok et al. 2017**). Los casos con mutación de *POLE* se asocian a fenotipos ultramutados y buen pronóstico (**Cancer Genome Atlas Research et al. 2013**), lo que podría suponer buena respuesta a los tratamientos de inmunoterapia. En el cáncer de pulmón ha sido poco estudiado, pero encontramos un estudio con 319 pacientes con CPCNP en los que se encuentra en 9 de ellos (2,8%) mutación de *POLE*. En los 9 pacientes con la mutación encuentran que tienen mayor carga mutacional, expresión de PD-L1 (valorado con el clon SP263) y mayor infiltrado de CD8, que los pacientes no mutados. Por ello, proponen las mutaciones de *POLE* como un posible candidato biomarcador de respuesta a inmunoterapia (**Song et al. 2018**). En otro estudio Liu y col, con 513 AD y 497 CE de pulmón, encuentran asociación entre buen pronóstico y mutación de *POLE* en los CE; y en el subtipo AD, si asocia alta expresión de PD-L1 (definida como > 20%). En los AD con mutación de *POLE* no se vio relación estadísticamente significativa con abundantes TIL ni valor pronóstico (**Liu et al. 2018**).

Es interesante señalar que, de los **genes** que vemos **asociados con** el grupo de pacientes **con expresión de PD-L1 ( $\geq 1\%$ ) y grado no G3**; solo hemos encontrado referencias con el gen *BAK1*. Encontramos que Gu y col encuentran asociación del gen *BAK1* en la proliferación y apoptosis del CPCNP *in vitro*, mediante alteraciones en el microRNA (miR-150) que afectan a su expresión (**Gu et al. 2014**).

Por último, es digno de mención que, en todos estos estudios, a diferencia del nuestro, no hacen correlación con datos clínico-patológicos, salvo los referidos al gen *POLE*, que incluyen la valoración de la expresión de PD-L1, pero no el grado histológico.

Adicionalmente en nuestro estudio de análisis de expresión de ARN, también hemos valorado la relación con el valor pronóstico y la concordancia con los valores de expresión de PD-L1 y de densidad y número absoluto de CD8.

En este sentido es relevante señalar, que no hemos visto concordancia entre la expresión de RNA de *PD-L1* y la expresión proteica de PD-L1 (estudiado mediante IHQ con los clones estudiados) a diferencia de otros estudios que sí encuentran correlación estadísticamente significativa (**Yu et al. 2019**). En esta discordancia pueden estar influyendo distintos factores como que en el estudio de Yu y col, los casos son únicamente CE y no incluyen AD, como en el nuestro, y que es distinto el sistema de estudio arrays. En nuestro caso usamos un sistema más antiguo, que puede ser menos preciso que los actuales.

Con respecto al valor pronóstico, estudiamos los genes que mejoran los modelos pronósticos de SLE y SG que hallamos con los datos clínico-patológicos y de genes ya conocidos, descritos en el apartado de resultados 4.6.

Aunque en los análisis univariantes no vimos relación estadísticamente significativa, del infiltrado CD8 ni de la expresión de PD-L1, con la supervivencia, cuando buscamos estos modelos pronósticos formados por distintas variables sí encontramos significación.

En SG tomando como grupo de referencia los pacientes no fumadores, sí encontramos que la densidad de linfocitos CD8+ en estroma peritumoral (EPT) es factor de riesgo junto al hábito tabáquico; y la densidad de linfocitos CD8+ en estroma intratumoral (EIT) es factor .Encontramos que la capacidad predictiva de este modelo (que incluye hábito tabáquico, porcentaje de GL positivos, densidad de CD8 en EPT y EIT), mejora (índice de Harrel de 0,76 -0,73) añadiendo la valoración de los genes *NGDN*, *MYOD1*, *ADCYAP1R1* y *CCL17* (todos como factores protectores, salvo *NGDN* que es de riesgo).

Igualmente, en el modelo pronóstico de SLE, la expresión de PD-L1 en IC, con el clon 28-8, tiene valor pronóstico protector. Este modelo, que toma como referencia los AD sin patrón micropapilar, e incluye subtipo histológico, expresión de D-L1 en IC, expresión de RNA de *PD-L1* y expresión de RNA de *EGFR*, mejora añadiendo el valor de los genes *CDH7*, *WDR26*, *UBXN11* y *ADIPOR1* (todos como factores protectores, salvo *CDH7* que es de riesgo), con índices de Harrel de entre 0,81 y 0,82.

De los genes en los que hemos visto relación con el pronóstico en estos modelos, encontramos algunos estudios en la literatura, relacionados con el carcinoma de pulmón. Algunos estudios, encuentran relación entre la expresión del receptor *ADIPOR1* y un pronóstico favorable en CPNCP; y niveles bajos de expresión de RMAm de *ADIPOR1* y *ADIPOR2* en las muestras de tumor, frente a las de pulmón no tumoral y en los pacientes con metástasis ganglionares (**Abdul-Ghafar et al. 2013**). También hay estudios que relacionan adiponectina con migración e invasión mediante la relación con la transición epitelio-mesénquima en el CPNCP (**Cui et al. 2018**); y con procesos diversos de proliferación, apoptosis, invasión y angiogénesis, como indican en la revisión de Boura y col en el CPNCP (**Boura et al. 2015**). Con respecto al gen *WDR26*, aunque no hemos encontrado relación con cáncer de pulmón, está descrita su sobreexpresión en líneas celulares y en tejido tumoral de cáncer de mama y la correlación con menor supervivencia (**Ye et al. 2016**).

Del modelo de SG también encontramos genes que merecen interés. Del gen *NGDN* (o *EIF4E-binding protein*), está descrito que la expresión de la proteína fosforilada EIF4E (p-4E-BP1 Thr70) es mayor en los CPCNP con tumores de > 3 cm y metástasis ganglionares, y que se relaciona con peor supervivencia global (**Lee et al. 2015**). Otros autores estudian la expresión de

EIF4E y de la proteína de unión a EIF4E, en 80 pacientes con AD de pulmón estadio I, y encuentran que la alta expresión de EIF4E está en relación con peor supervivencia, pero la alta expresión de la proteína de unión a EIF4E con mejor pronóstico, de manera que el grupo con elevado EIF4E/ bajo EIF4EBP es el de menor supervivencia (**Seki et al. 2010**). Con respecto al gen *CCL17*, encontramos únicamente que Biragyn y col, mediante un modelo en ratón de cáncer de mama, observan que se inhiben las metástasis pulmonares con la citoquina CCL17 mediante silenciamiento de genes en cel T regs CCR4+ (**Biragyn et al. 2013**). Kinoshita T y col, encuentran que los macrófagos M2-like CD163+ CCL17+ pueden contribuir al potencial microambiente desfavorable (inmunosuprimido) en pacientes no fumadores con AD de pulmón, que puedan promover la progresión tumoral (**Kinoshita et al. 2017**).

Aunque no es el objetivo principal del estudio, la valoración pronóstica de la expresión génica, el tamaño muestral es escaso y la técnica de codelink usada no es equivalente a las técnicas actuales, los resultados encontrados en relación al valor pronóstico, junto al resto de datos que hemos estudiado de los genes *ADIPOR1*, *WDR 26*, *NGDN* y *CCL17* y la asociación con la expresión de PD-L1 con algunos genes como *POLE*, parecen interesantes y han sido descritas en la literatura con respecto al CPNCP. Lo que abre las puertas a futuros estudios más amplios para ver el valor real de estos genes en relación al cáncer de pulmón y su probable relación con PD-L1 y respuesta a inmunoterapia.

En conclusión, hemos confirmado en nuestro estudio el valor de la histología especialmente del subtipo micropapilar de adenocarcinoma, la equivalencia entre los clones estudiados y la buena concordancia entre observadores en la valoración de PD-L1 en células tumorales. Aunque no hemos podido encontrar en nuestra serie relación del infiltrado T CD8+ con la supervivencia, sí creemos que es un factor importante pronóstico y, asociado con otros biomarcadores como PD-L1, puede contribuir a una mejor selección de los pacientes subsidiarios de recibir un tratamiento con inhibidores de PD1-PD-L1. En este aspecto es importante una determinación lo más objetiva posible y la patología digital puede ayudar a realizar unas determinaciones más precisas y más reproducibles, si se establecen claras directrices para la selección de áreas a valorar y se establecen puntos de corte homogéneos. Por otro lado, aunque ha sido modesta nuestra aproximación, es indudable la importancia de los estudios genómicos para definir de forma más precisa el CPNCP, identificar genes que tengan valor pronóstico o puedan suponer nuevas dianas terapéuticas, además de ayudar a una mejor selección de los pacientes para los tratamientos más adecuados a su perfil génico.

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES.

1. Como objetivo principal del estudio, en relación con la expresión de PD-L1, tanto en TC como en IC, no hemos observado valor pronóstico en SLE ni SG. Tampoco hemos encontrado valor pronóstico en relación al número absoluto ni la densidad de los linfocitos CD8, en ninguno de los compartimentos estudiados.
2. En nuestra serie se confirma, una buena concordancia intraobservador en la valoración de PD-L1 con los clones 22C3 y 28-8, tanto en la valoración de TC como en IC (CCI de 0,99 y 0,93 respectivamente).
3. Hay una buena concordancia interobservador en la valoración de PD-L1 en TC con los clones 22C3 y 28-8 (CCI de 0,90 y de 0,93 respectivamente). Sin embargo, no se encuentra concordancia en la valoración de IC.
4. Se ha encontrado correlación entre la expresión de PD-L1 en TC y los datos clínico-patológicos: hábito tabáquico ( $p \leq 0,048$ ); grado histológico G3 ( $p \leq 0,001$ ) y estadio N ( $p \leq 0,013$ ) con ambos clones.
5. Se observa correlación entre la expresión proteica de PD-L1 en IC, y el número y densidad de linfocitos CD8 en los compartimentos de estroma peritumoral e intraepitelial con ambos clones ( $p \leq 0,03$ ). Sin embargo, no encontramos correlación entre expresión de PD-L1 en TC y linfocitos CD8.
6. En el subtipo AD sin componente micropapilar, se ha encontrado mejor SLE, que en AD con componente micropapilar y CE (HR=4,6 y 3,8;  $p=0,025$ , respectivamente). También se ha visto mejor SG en el subtipo AD frente a no AD y en el grado histológico no G3 frente a G3 ( $p \leq 0,018$ ).
7. Las muestras de hasta 10 años de antigüedad, como en nuestro estudio, son válidas para la determinación de PD-L1, si se realiza con un material bien preservado y los controles adecuados.
8. No hemos encontrado asociación estadísticamente significativa, entre la expresión de ARN de PD-L1 estudiada mediante arrays y su expresión proteica.
9. Encontramos un perfil génico en los pacientes con PD-L1  $\geq 50\%$  y en los PD-L1  $\geq 1\%$ , en los subgrupos de grado histológico no G3 (G1 y G2) y estadio I-II.
10. Se ha identificado un modelo de potencial pronóstico de SLE con el subtipo histológico, expresión proteica de PD-L1 en IC y expresión de ARN de los genes *EGFR*, *PD-L1*, *CDH7*, *WDR26*, *UBXN11* y *ADIPOR1*; y un modelo de SG con el hábito tabáquico, porcentaje de

ganglios positivos, densidad de CD8 en estroma intratumoral y peritumoral, y con la expresión de ARN de los genes *CCL17*, *ADCYAP1R1*, *MYOD1* y *NGDN* ; con una buena capacidad predictiva (índices de Harrell entre 0,73 a 0,82).



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Ghafar, J., S. S. Oh, S. M. Park, *et al.* (2013). "Expression of adiponectin receptor 1 is indicative of favorable prognosis in non-small cell lung carcinoma." *Tohoku J Exp Med* **229**(2): 153-162.

Adam, J., N. Le Stang, I. Rouquette, *et al.* (2018). "Multicenter harmonization study for PD-L1 IHC testing in non-small-cell lung cancer." *Ann Oncol* **29**(4): 953-958.

Ameratunga, M., K. Asadi, X. Lin, *et al.* (2016). "PD-L1 and Tumor Infiltrating Lymphocytes as Prognostic Markers in Resected NSCLC." *PLoS One* **11**(4): e0153954.

Azuma, K., K. Ota, A. Kawahara, *et al.* (2014). "Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer." *Ann Oncol* **25**(10): 1935-1940.

Bhaijee, F. and R. A. Anders (2016). "PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker: Is Absence of Proof the Same as Proof of Absence?" *JAMA Oncol* **2**(1): 54-55.

Biragyn, A., M. Bodogai, P. B. Olkhanud, *et al.* (2013). "Inhibition of lung metastasis by chemokine CCL17-mediated in vivo silencing of genes in CCR4+ Tregs." *J Immunother* **36**(4): 258-267.

Bironzo, P. and M. Di Maio (2018). "A review of guidelines for lung cancer." *J Thorac Dis* **10**(Suppl 13): S1556-S1563.

Borczuk, A. C. and T. C. Allen (2016). "PD-L1 and Lung Cancer: The Era of Precision-ish Medicine?" *Arch Pathol Lab Med* **140**(4): 351-354.

Borghaei, H., L. Paz-Ares, L. Horn, *et al.* (2015). "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer." *N Engl J Med* **373**(17): 1627-1639.

Boura, P., S. Loukides, D. Grapsa, *et al.* (2015). "The diverse roles of adiponectin in non-small-cell lung cancer: current data and future perspectives." *Future Oncol* **11**(15): 2193-2203.

Brahmer, J., K. L. Reckamp, P. Baas, *et al.* (2015). "Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer." *N Engl J Med* **373**(2): 123-135.

Brambilla, E., G. Le Teuff, S. Marguet, *et al.* (2016). "Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Clin Oncol* **34**(11): 1223-1230.

Brustugun, O. T., B. Moller and A. Helland (2014). "Years of life lost as a measure of cancer burden on a national level." *Br J Cancer* **111**(5): 1014-1020.

Buttner, R., J. R. Gosney, B. G. Skov, *et al.* (2017). "Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Clin Oncol* **35**(34): 3867-3876.

Caminoa-Lizarralde, M. A. (2018). "El contexto inmune y molecular de la expresión proteica de PD-L1 en el carcinoma escamoso de pulmón en estadios iniciales." *Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad San Pablo CEU.*

Campbell, J. D., A. Alexandrov, J. Kim, *et al.* (2016). "Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas." *Nat Genet* **48**(6): 607-616.

Cancer Genome Atlas Research, N., C. Kandoth, N. Schultz, *et al.* (2013). "Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma." *Nature* **497**(7447): 67-73.

Conde, E., B. Angulo, P. Redondo, *et al.* (2010). "The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung." *PLoS One* **5**(8): e12209.

Conde, E., A. Caminoa, C. Dominguez, *et al.* (2018). "Aligning digital CD8(+) scoring and targeted next-generation sequencing with programmed death ligand 1 expression: a pragmatic approach in early-stage squamous cell lung carcinoma." *Histopathology* **72**(2): 270-284.

Conde E, G.-R. J., López-Ríos F (2015). *VIII. Biomarcadores con interés predictivo en el carcinoma de pulmón. Recomendaciones del Club de Patología Pulmonar de la SEAP.* Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 445-447.

Cooper, W. A., P. A. Russell, M. Cherian, *et al.* (2017). "Intra- and Interobserver Reproducibility Assessment of PD-L1 Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **23**(16): 4569-4577.

Cooper, W. A., T. Tran, R. E. Vilain, *et al.* (2015). "PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma." *Lung Cancer* **89**(2): 181-188.

Cui, E., H. Guo, M. Shen, *et al.* (2018). "Adiponectin inhibits migration and invasion by reversing epithelial-mesenchymal transition in nonsmall cell lung carcinoma." *Oncol Rep* **40**(3): 1330-1338.

Cha, M. J., H. Y. Lee, K. S. Lee, *et al.* (2014). "Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome." *J Thorac Cardiovasc Surg* **147**(3): 921-928 e922.

Chan, A. W. H., J. H. M. Tong, J. S. H. Kwan, *et al.* (2018). "Assessment of programmed cell death ligand-1 expression by 4 diagnostic assays and its clinicopathological correlation in a large cohort of surgical resected non-small cell lung carcinoma." *Mod Pathol* **31**(9): 1381-1390.

Chen, D. S., B. A. Irving and F. S. Hodi (2012). "Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1." *Clin Cancer Res* **18**(24): 6580-6587.

Chen, N., W. Fang, J. Zhan, *et al.* (2015). "Upregulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-Driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation." *J Thorac Oncol* **10**(6): 910-923.

Chen, Y. B., C. Y. Mu and J. A. Huang (2012). "Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study." *Tumori* **98**(6): 751-755.

Choi, M., H. Kadara, J. Zhang, *et al.* (2017). "Mutation profiles in early-stage lung squamous cell carcinoma with clinical follow-up and correlation with markers of immune function." *Ann Oncol* **28**(1): 83-89.

Chowdhury, P. S., K. Chamoto and T. Honjo (2018). "Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy." *J Intern Med* **283**(2): 110-120.

Dietel M, S. N., Salanova R, *et al* (2018). "1300 Real-world prevalence of PD-L1 expression in locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): The global, multicenter EXPRESS study." *Journal of Thoracic Oncology* **13**(4): S74-S75.

Donnem, T., S. M. Hald, E. E. Paulsen, *et al.* (2015). "Stromal CD8+ T-cell Density-A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **21**(11): 2635-2643.

Donnem, T., T. K. Kilvaer, S. Andersen, *et al.* (2016). "Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer." *Ann Oncol* **27**(2): 225-232.

Driver, B. R., R. A. Miller, T. Miller, *et al.* (2017). "Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Expression in Either Tumor Cells or Tumor-Infiltrating Immune Cells Correlates With Solid and High-Grade Lung Adenocarcinomas." *Arch Pathol Lab Med* **141**(11): 1529-1532.

Du, L., R. S. Herbst and D. Morgensztern (2017). "Immunotherapy in Lung Cancer." *Hematol Oncol Clin North Am* **31**(1): 131-141.

Fehrenbacher, L., A. Spira, M. Ballinger, *et al.* (2016). "Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial." *Lancet* **387**(10030): 1837-1846.

Felip, E., A. Concha, J. de Castro, *et al.* (2015). "Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology." *Clin Transl Oncol* **17**(2): 103-112.

Feng, W., Y. Li, L. Shen, *et al.* (2016). "Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with completely resected stage IIIA(N2) non-small cell lung cancer." *Oncotarget* **7**(6): 7227-7240.

Ferrara, R., L. Mezquita and B. Besse (2018). "Progress in the Management of Advanced Thoracic Malignancies in 2017." *J Thorac Oncol* **13**(3): 301-322.

Festino, L., G. Botti, P. Lorigan, *et al.* (2016). "Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection?" *Drugs* **76**(9): 925-945.

Galon, J., F. Pages, F. M. Marincola, *et al.* (2012). "Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force." *J Transl Med* **10**: 205.

Garcia-Campelo, R., R. Bernabe, M. Cobo, *et al.* (2015). "SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015." *Clin Transl Oncol* **17**(12): 1020-1029.

Garon, E. B., N. A. Rizvi, R. Hui, *et al.* (2015). "Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer." *N Engl J Med* **372**(21): 2018-2028.

Geng, Y., Y. Shao, W. He, *et al.* (2015). "Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis." *Cell Physiol Biochem* **37**(4): 1560-1571.

Gibney, G. T., L. M. Weiner and M. B. Atkins (2016). "Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy." *Lancet Oncol* **17**(12): e542-e551.

Gniadek, T. J., Q. K. Li, E. Tully, *et al.* (2017). "Heterogeneous expression of PD-L1 in pulmonary squamous cell carcinoma and adenocarcinoma: implications for assessment by small biopsy." *Mod Pathol* **30**(4): 530-538.

Goldstraw, P., D. Ball, J. R. Jett, *et al.* (2011). "Non-small-cell lung cancer." *Lancet* **378**(9804): 1727-1740.

Grenier, J. M., S. T. Yeung and K. M. Khanna (2018). "Combination Immunotherapy: Taking Cancer Vaccines to the Next Level." *Front Immunol* **9**: 610.

Grigg, C. and N. A. Rizvi (2016). "PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: truth or fiction?" *J Immunother Cancer* **4**: 48.

Gu, X. Y., J. Wang, Y. Z. Luo, *et al.* (2014). "Down-regulation of miR-150 induces cell proliferation inhibition and apoptosis in non-small-cell lung cancer by targeting BAK1 in vitro." *Tumour Biol* **35**(6): 5287-5293.

Han, Z., T. Wang, S. Han, *et al.* (2017). "Low-expression of TMEM100 is associated with poor prognosis in non-small-cell lung cancer." *Am J Transl Res* **9**(5): 2567-2578.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Hanna, N., D. Johnson, S. Temin, *et al.* (2017). "Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update." *J Clin Oncol* **35**(30): 3484-3515.

Hargadon, K. M., C. E. Johnson and C. J. Williams (2018). "Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors." *Int Immunopharmacol* **62**: 29-39.

Hegde, P. S., V. Karanikas and S. Evers (2016). "The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition." *Clin Cancer Res* **22**(8): 1865-1874.

Herbst, R. S., P. Baas, D. W. Kim, *et al.* (2016). "Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial." *Lancet* **387**(10027): 1540-1550.

Herbst, R. S., P. Baas, J. L. Perez-Gracia, *et al.* (2016). "PD1.06 (also presented as P2.41): Pembrolizumab vs Docetaxel for Previously Treated NSCLC (KEYNOTE-010): Archival vs New Tumor Samples for PD-L1 Assessment." *J Thorac Oncol* **11**(10S): S174-S175.

Hirsch, F. R., A. McElhinny, D. Stanforth, *et al.* (2017). "PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project." *J Thorac Oncol* **12**(2): 208-222.

Horne, Z. D., R. Jack, Z. T. Gray, *et al.* (2011). "Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer." *J Surg Res* **171**(1): 1-5.

Ilie, M., S. Khambata-Ford, C. Copie-Bergman, *et al.* (2017). "Use of the 22C3 anti-PD-L1 antibody to determine PD-L1 expression in multiple automated immunohistochemistry platforms." *PLoS One* **12**(8): e0183023.

Ilie, M., E. Long-Mira, C. Bence, *et al.* (2016). "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." *Ann Oncol* **27**(1): 147-153.

Kadara, H., M. Choi, J. Zhang, *et al.* (2017). "Whole-exome sequencing and immune profiling of early-stage lung adenocarcinoma with fully annotated clinical follow-up." *Ann Oncol* **28**(1): 75-82.

Kadota, K., J. Villena-Vargas, A. Yoshizawa, *et al.* (2014). "Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease." *Am J Surg Pathol* **38**(4): 448-460.



Kadota, K., Y. C. Yeh, C. S. Sima, *et al.* (2014). "The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype." *Mod Pathol* **27**(5): 690-700.

Kalemkerian, G. P., N. Narula, E. B. Kennedy, *et al.* (2018). "Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update." *J Clin Oncol* **36**(9): 911-919.

Kang, X., H. Liu, M. W. Onaitis, *et al.* (2016). "Polymorphisms of the centrosomal gene (FGFR1OP) and lung cancer risk: a meta-analysis of 14,463 cases and 44,188 controls." *Carcinogenesis* **37**(3): 280-289.

Kerr, K. M. and F. R. Hirsch (2016). "Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry: Friend or Foe?" *Arch Pathol Lab Med* **140**(4): 326-331.

Kerr, K. M. and M. C. Nicolson (2016). "Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist." *Arch Pathol Lab Med* **140**(3): 249-254.

Kilic, A., R. J. Landreneau, J. D. Luketich, *et al.* (2011). "Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors." *J Surg Res* **167**(2): 207-210.

Kim, J., A. C. Myers, L. Chen, *et al.* (2005). "Constitutive and inducible expression of b7 family of ligands by human airway epithelial cells." *Am J Respir Cell Mol Biol* **33**(3): 280-289.

Kim, M. Y., J. Koh, S. Kim, *et al.* (2015). "Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: Comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers." *Lung Cancer* **88**(1): 24-33.

Kinoshita, T., C. Kudo-Saito, R. Muramatsu, *et al.* (2017). "Determination of poor prognostic immune features of tumour microenvironment in non-smoking patients with lung adenocarcinoma." *Eur J Cancer* **86**: 15-27.

Kitazono, S., Y. Fujiwara, K. Tsuta, *et al.* (2015). "Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non--Small-Cell Lung Cancer." *Clin Lung Cancer* **16**(5): 385-390.

Lee, H. W., E. H. Lee, J. H. Lee, *et al.* (2015). "Prognostic significance of phosphorylated 4E-binding protein 1 in non-small cell lung cancer." *Int J Clin Exp Pathol* **8**(4): 3955-3962.

Lee, S. K., S. H. Seo, B. S. Kim, *et al.* (2005). "IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells." *J Dermatol Sci* **40**(2): 95-103.

Lester, S. C. (2010). "Manual of surgical pathology." *3ª Ed Elsevier*.

Lin, C., X. Chen, M. Li, *et al.* (2015). "Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma." *Clin Lung Cancer* **16**(5): e25-35.

Lindeman, N. I., P. T. Cagle, D. L. Aisner, *et al.* (2018). "Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology." *J Thorac Oncol* **13**(3): 323-358.

Lindeman, N. I., P. T. Cagle, D. L. Aisner, *et al.* (2018). "Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology." *J Mol Diagn* **20**(2): 129-159.

Lindeman, N. I., P. T. Cagle, D. L. Aisner, *et al.* (2018). "Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology." *Arch Pathol Lab Med* **142**(3): 321-346.

Liu, L., J. Ruiz, S. S. O'Neill, *et al.* (2018). "Favorable outcome of patients with lung adenocarcinoma harboring POLE mutations and expressing high PD-L1." *Mol Cancer* **17**(1): 81.

Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, *et al.* (2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." *Lancet* **380**(9859): 2095-2128.

Ma, W., B. M. Gilligan, J. Yuan, *et al.* (2016). "Current status and perspectives in translational biomarker research for PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade therapy." *J Hematol Oncol* **9**(1): 47.

Mano, Y., K. Takahashi, N. Ishikawa, *et al.* (2007). "Fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner as a novel prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer." *Cancer Sci* **98**(12): 1902-1913.

Mansour, M., Z. L. Teo, S. J. Luen, *et al.* (2017). "Advancing Immunotherapy in Metastatic Breast Cancer." *Curr Treat Options Oncol* **18**(6): 35.

Marshall, H. T. and M. B. A. Djamgoz (2018). "Immuno-Oncology: Emerging Targets and Combination Therapies." *Front Oncol* **8**: 315.

Mazzone, R., C. Zwergel, A. Mai, *et al.* (2017). "Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy." *Clin Epigenetics* **9**: 59.

McDermott, D. F. and M. B. Atkins (2013). "PD-1 as a potential target in cancer therapy." *Cancer Med* **2**(5): 662-673.

Meng, X., Z. Huang, F. Teng, *et al.* (2015). "Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy." *Cancer Treat Rev* **41**(10): 868-876.

Meyers, D. E., P. M. Bryan, S. Banerji, *et al.* (2018). "Targeting the PD-1/PD-L1 axis for the treatment of non-small-cell lung cancer." *Curr Oncol* **25**(4): e324-e334.

Nair, S., N. Bora-Singhal, D. Perumal, *et al.* (2014). "Nicotine-mediated invasion and migration of non-small cell lung carcinoma cells by modulating STMN3 and GSPT1 genes in an ID1-dependent manner." *Mol Cancer* **13**: 173.

Neuman, T., M. London, J. Kania-Almog, *et al.* (2016). "A Harmonization Study for the Use of 22C3 PD-L1 Immunohistochemical Staining on Ventana's Platform." *J Thorac Oncol* **11**(11): 1863-1868.

Nicholson, A. G., M. S. Tsao, W. D. Travis, *et al.* (2018). "Eighth Edition Staging of Thoracic Malignancies: Implications for the Reporting Pathologist." *Arch Pathol Lab Med* **142**(5): 645-661.

Nitadori, J., A. J. Bograd, K. Kadota, *et al.* (2013). "Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2cm or smaller." *J Natl Cancer Inst* **105**(16): 1212-1220.

Novello, S., F. Barlesi, R. Califano, *et al.* (2016). "Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **27**(suppl 5): v1-v27.

Ock, C. Y., B. Keam, S. Kim, *et al.* (2016). "Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration." *Clin Cancer Res* **22**(9): 2261-2270.

Ott, P. A., F. S. Hodi and C. Robert (2013). "CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients." *Clin Cancer Res* **19**(19): 5300-5309.

Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 252-264.

Patel, S. A. and A. J. Minn (2018). "Combination Cancer Therapy with Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies." *Immunity* **48**(3): 417-433.

Petrelli, F., M. Maltese, G. Tomasello, *et al.* (2018). "Clinical and Molecular Predictors of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer: Systematic Review and Meta-analysis." *Clin Lung Cancer* **19**(4): 315-322.

Phillips, T., P. Simmons, H. D. Inzunza, *et al.* (2015). "Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **23**(8): 541-549.

Postmus, P. E., K. M. Kerr, M. Oudkerk, *et al.* (2017). "Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **28**(suppl\_4): iv1-iv21.

Qin, H., F. Wang, H. Liu, *et al.* (2018). "New advances in immunotherapy for non-small cell lung cancer." *Am J Transl Res* **10**(8): 2234-2245.

Ramamurthy, C., J. L. Godwin and H. Borghaei (2017). "Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: What Line of Therapy and How to Choose?" *Curr Treat Options Oncol* **18**(6): 33.

Ratcliffe, M. J., A. Sharpe, A. Midha, *et al.* (2017). "Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **23**(14): 3585-3591.

Reck, M., D. Rodriguez-Abreu, A. G. Robinson, *et al.* (2016). "Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer." *N Engl J Med* **375**(19): 1823-1833.

Rehman, J. A., G. Han, D. E. Carvajal-Hausdorf, *et al.* (2017). "Quantitative and pathologist-read comparison of the heterogeneity of programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer." *Mod Pathol* **30**(3): 340-349.

Remark, R., C. Becker, J. E. Gomez, *et al.* (2015). "The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome." *Am J Respir Crit Care Med* **191**(4): 377-390.

Remon, J., N. Chaput and D. Planchard (2016). "Predictive biomarkers for programmed death-1/programmed death ligand immune checkpoint inhibitors in nonsmall cell lung cancer." *Curr Opin Oncol* **28**(2): 122-129.

Ribas, A. (2012). "Tumor immunotherapy directed at PD-1." *N Engl J Med* **366**(26): 2517-2519.

Rimm, D. L., G. Han, J. M. Taube, *et al.* (2017). "A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer." *JAMA Oncol* **3**(8): 1051-1058.

Rittmeyer, A., F. Barlesi, D. Waterkamp, *et al.* (2017). "Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial." *Lancet* **389**(10066): 255-265.

Rizvi, N. A., M. D. Hellmann, A. Snyder, *et al.* (2015). "Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer." *Science* **348**(6230): 124-128.

Roge, R., M. Vyberg and S. Nielsen (2017). "Accurate PD-L1 Protocols for Non-Small Cell Lung Cancer can be Developed for Automated Staining Platforms With Clone 22C3." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **25**(6): 381-385.

Rosell, R. and N. Karachaliou (2016). "Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer." *Lancet* **387**(10026): 1354-1356.

Ruffini, E., S. Ascoli, P. L. Filosso, *et al.* (2009). "Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in lung neoplasms." *Ann Thorac Surg* **87**(2): 365-371; discussion 371-362.

Russell, P. A., S. A. Barnett, M. Walkiewicz, *et al.* (2013). "Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients." *J Thorac Oncol* **8**(4): 461-468.

Sacher, A. G. and L. Gandhi (2016). "Biomarkers for the Clinical Use of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review." *JAMA Oncol* **2**(9): 1217-1222.

Salgado, R., C. Denkert, S. Demaria, *et al.* (2015). "The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014." *Ann Oncol* **26**(2): 259-271.

Schalper, K. A., D. Carvajal-Hausdorf, J. McLaughlin, *et al.* (2017). "Differential Expression and Significance of PD-L1, IDO-1, and B7-H4 in Human Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **23**(2): 370-378.

Scheel, A. H., M. Dietel, L. C. Heukamp, *et al.* (2016). "Harmonized PD-L1 immunohistochemistry for pulmonary squamous-cell and adenocarcinomas." *Mod Pathol* **29**(10): 1165-1172.

Schmidt, L. H., A. Kummel, D. Gorlich, *et al.* (2015). "PD-1 and PD-L1 Expression in NSCLC Indicate a Favorable Prognosis in Defined Subgroups." *PLoS One* **10**(8): e0136023.

Seki, N., T. Takasu, S. Sawada, *et al.* (2010). "Prognostic significance of expression of eukaryotic initiation factor 4E and 4E binding protein 1 in patients with pathological stage I invasive lung adenocarcinoma." *Lung Cancer* **70**(3): 329-334.

Shien, K., V. A. Papadimitrakopoulou and Wistuba, II (2016). "Predictive biomarkers of response to PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* **99**: 79-87.

Sholl, L. M., D. L. Aisner, T. C. Allen, *et al.* (2016). "Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemistry--A New Challenge for Pathologists: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society." *Arch Pathol Lab Med* **140**(4): 341-344.

Shukuya, T. and D. P. Carbone (2016). "Predictive Markers for the Efficacy of Anti-PD-1/PD-L1 Antibodies in Lung Cancer." *J Thorac Oncol* **11**(7): 976-988.

Sica, G. L. and S. S. Ramalingam (2017). "Assays for PD-L1 Expression: Do All Roads Lead to Rome?" *JAMA Oncol* **3**(8): 1058-1059.

Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2015." *CA Cancer J Clin* **65**(1): 5-29.

Song, Z., G. Cheng, C. Xu, *et al.* (2018). "Clinicopathological characteristics of POLE mutation in patients with non-small-cell lung cancer." *Lung Cancer* **118**: 57-61.

Sun, J. M., W. Zhou, Y. L. Choi, *et al.* (2016). "Prognostic Significance of PD-L1 in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: A Large Cohort Study of Surgically Resected Cases." *J Thorac Oncol* **11**(7): 1003-1011.

Suzuki, K., K. Kadota, C. S. Sima, *et al.* (2013). "Clinical impact of immune microenvironment in stage I lung adenocarcinoma: tumor interleukin-12 receptor beta2 (IL-12Rbeta2), IL-7R, and stromal FoxP3/CD3 ratio are independent predictors of recurrence." *J Clin Oncol* **31**(4): 490-498.

Talhok, A., M. K. McConechy, S. Leung, *et al.* (2017). "Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer." *Cancer* **123**(5): 802-813.



Tang, Y., W. Fang, Y. Zhang, *et al.* (2015). "The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs." *Oncotarget* **6**(16): 14209-14219.

Teng, J. P., Z. Y. Yang, Y. M. Zhu, *et al.* (2017). "The roles of ARHGAP10 in the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells." *Oncol Lett* **14**(4): 4613-4618.

Teng, M. W., S. F. Ngiow, A. Ribas, *et al.* (2015). "Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1." *Cancer Res* **75**(11): 2139-2145.

Topalian, S. L., J. M. Taube, R. A. Anders, *et al.* (2016). "Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **16**(5): 275-287.

Travis, W. D., H. Asamura, A. A. Bankier, *et al.* (2016). "The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer." *J Thorac Oncol* **11**(8): 1204-1223.

Travis, W. D., E. Brambilla, A. P. Burke, *et al.* (2015). "Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart." *J Thorac Oncol* **10**(9): 1240-1242.

Tsao, M. S., K. M. Kerr, M. Kockx, *et al.* (2018). "PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project." *J Thorac Oncol* **13**(9): 1302-1311.

Tsao, M. S., G. Le Teuff, F. A. Shepherd, *et al.* (2017). "PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer." *Ann Oncol* **28**(4): 882-889.

Tumeh, P. C., C. L. Harview, J. H. Yearley, *et al.* (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." *Nature* **515**(7528): 568-571.

Uruga, H., E. Bozkurtlar, T. G. Huynh, *et al.* (2017). "Programmed Cell Death Ligand (PD-L1) Expression in Stage II and III Lung Adenocarcinomas and Nodal Metastases." *J Thorac Oncol* **12**(3): 458-466.

- Velcheti, V., K. A. Schalper, D. E. Carvajal, *et al.* (2014). "Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer." *Lab Invest* **94**(1): 107-116.
- Vilain, R. E., A. M. Menzies, J. S. Wilmott, *et al.* (2017). "Dynamic Changes in PD-L1 Expression and Immune Infiltrates Early During Treatment Predict Response to PD-1 Blockade in Melanoma." *Clin Cancer Res* **23**(17): 5024-5033.
- Wang, A., H. Y. Wang, Y. Liu, *et al.* (2015). "The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis." *Eur J Surg Oncol* **41**(4): 450-456.
- Wang, J., Y. Duan, Q. H. Meng, *et al.* (2018). "Integrated analysis of DNA methylation profiling and gene expression profiling identifies novel markers in lung cancer in Xuanwei, China." *PLoS One* **13**(10): e0203155.
- Wang, W., T. Han, W. Tong, *et al.* (2018). "Overexpression of GPR35 confers drug resistance in NSCLC cells by beta-arrestin/Akt signaling." *Onco Targets Ther* **11**: 6249-6257.
- Wang, Y., W. Deng, N. Li, *et al.* (2018). "Combining Immunotherapy and Radiotherapy for Cancer Treatment: Current Challenges and Future Directions." *Front Pharmacol* **9**: 185.
- Wang, Y., J. Xia, Z. Fang, *et al.* (2017). "A novel BMX variant promotes tumor cell growth and migration in lung adenocarcinoma." *Oncotarget* **8**(20): 33405-33415.
- Warth, A., T. Muley, M. Meister, *et al.* (2012). "The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival." *J Clin Oncol* **30**(13): 1438-1446.
- Wilke, C. M., S. Wei, L. Wang, *et al.* (2011). "Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma." *Cancer Immunol Immunother* **60**(11): 1529-1541.
- Wu, P., D. Wu, L. Li, *et al.* (2015). "PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis." *PLoS One* **10**(6): e0131403.
- Xiang, X., P. C. Yu, D. Long, *et al.* (2017). "Prognostic value of PD -L1 expression in patients with primary solid tumors." *Oncotarget* **9**(4): 5058-5072.

Yang, C. Y., M. W. Lin, Y. L. Chang, *et al.* (2014). "Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes." *Eur J Cancer* **50**(7): 1361-1369.

Yang, Q., Z. Xu, L. Zheng, *et al.* (2018). "Multimodal detection of PD-L1: reasonable biomarkers for immune checkpoint inhibitor." *Am J Cancer Res* **8**(9): 1689-1696.

Ye, Y., X. Tang, Z. Sun, *et al.* (2016). "Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/ AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion." *Oncotarget* **7**(14): 17854-17869.

Yoshizawa, A., N. Motoi, G. J. Riely, *et al.* (2011). "Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases." *Mod Pathol* **24**(5): 653-664.

Yu, H., Z. Chen, K. V. Ballman, *et al.* (2019). "Correlation of PD-L1 Expression with Tumor Mutation Burden and Gene Signatures for Prognosis in Early-Stage Squamous Cell Lung Carcinoma." *J Thorac Oncol* **14**(1): 25-36.

Zeng, D. Q., Y. F. Yu, Q. Y. Ou, *et al.* (2016). "Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer." *Oncotarget* **7**(12): 13765-13781.

Zhang, Y., L. Wang, Y. Li, *et al.* (2014). "Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma." *Oncotargets Ther* **7**: 567-573.

## **APÉNDICE Y ANEXOS**

## APÉNDICE Y ANEXOS

### Índice de figuras.

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Imagen macroscópica de un adenocarcinoma con áreas de vidrio deslustrado (señalado con flechas el límite del tumor con el parénquima normal).  | 21 |
| <b>Figura 2.</b>  | Algoritmo diagnóstico en biopsias pequeñas/citologías (Modificado de Travis, 2011).  | 22 |
| <b>Figura 3.</b>  | Términos diagnósticos de adenocarcinoma en clasificación WHO 2015 (Adaptado de Travis, 2011).  | 23 |
| <b>Figura 4.</b>  | Esquema de estadio pT para adenocarcinomas hasta pT1. (Adaptado de Travis 2016).   | 25 |
| <b>Figura 5.</b>  | Esquema de los porcentajes de las mutaciones encontradas en adenocarcinomas de pulmón (A) y carcinoma escamoso (B). (Modificado de Rosell R. 2016).                                      | 29 |
| <b>Figura 6.</b>  | Figura resumen de los biomarcadores en inmunoterapia (adaptada de Qin t al, 2018).   | 33 |
| <b>Figura 7.</b>  | Clasificación de los tumores basados en la expresión de PD-L1 y la infiltración de linfocitos T (Modificado de Teng, 2015).  | 35 |
| <b>Figura 8.</b>  | Esquema de la forma de puntuación de la expresión de PD-L1 y los controles usados.   | 46 |
| <b>Figura 9.</b>  | Valoración automatizada de TILs CD8+ en la plataforma VENTANA iScan (Ventana Medical System).  | 48 |
| <b>Figura 10.</b> | Esquema del procesado. Modificado del manual de instrucciones del sistema de bioarray de expresión CodeLink (GE Healthcare/Amersham Biosciences).  | 49 |
| <b>Figura 11.</b> | Carcinoma Adenoescamoso (Imágenes 1, 2 y 3 H-E x40; 4 H-E x400 y 5 PAS-D x 200)  | 57 |
| <b>Figura 12.</b> | Carcinoma Epidermoide Queratinizante, moderadamente diferenciado G2 (H-E x 100).   | 57 |
| <b>Figura 13.</b> | Carcinoma Epidermoide Queratinizante, pobremente diferenciado G3 (H-E Izda. x400; Dcha. x200).   | 58 |
| <b>Figura 14.</b> | Carcinoma Epidermoide No Queratinizante G3 (Izda. H-E x400; Dcha. IHQ p63 x 20).   | 58 |
| <b>Figura 15.</b> | Adenocarcinoma de patrón lepidico G1 (A: Mucinoso, H-E x 40 y B: No mucinoso, H-E x 20).   | 59 |
| <b>Figura 16.</b> | Adenocarcinoma de patrón acinar G2 (H-E, Dcha. x 20; Izda. superior e inferior x 200).   | 59 |
| <b>Figura 17.</b> | Adenocarcinoma de patrón papilar G2 (H-E, Izda. x 40; Dcha. x 100).  | 60 |
| <b>Figura 18.</b> | Adenocarcinoma de patrón micropapilar G3 (H-E x 200).  | 60 |
| <b>Figura 19.</b> | Adenocarcinoma de patrón sólido G3, definido por técnicas histoquímicas (A) (Id H-E x 200; Drcha. PAS-D x 200) o inmunohistoquímicas (B) (Dcha. H-E x 400, Izda. IHQ TTF-1 y p40 x 100). | 61 |

|                    |  |    |
|--------------------|--|----|
| <b>Figura 20.</b>  | Heterogeneidad en la tinción de PD-L1. 1 Patrón mosaico (x200) y 2 Patrón geográfico (x40).  | 67 |
| <b>Figura 21.</b>  | Ejemplos de Imágenes de la expresión de PD-L1 con los dos clones en los mismos casos (Imágenes superiores x 20; medias e inferiores x 40).   | 68 |
| <b>Figura. 22.</b> | Expresión de PD-L1 en los distintos grupos según ensayos (x 200).  | 71 |
| <b>Figura 23.</b>  | Según criterios de Brambilla (Brambilla et al. 2016). 1. Infiltrado inflamatorio intenso. 2. Infiltrado inflamatorio no intenso. (H-E x 40).   | 78 |
| <b>Figura 24.</b>  | Ejemplos de diferentes densidades de TILs CD8+, en los distintos compartimentos estudiados analizados de forma automatizada con la plataforma VENTANA iScan (Ventana Medical System) (x200). | 80 |
| <b>Figura 25.</b>  | Heatmap de la expresión de los 16600 genes estudiados frente a la expresión proteica de PD-L1 en los puntos de corte de 50, 25 y 1 %.  | 85 |

**Índice de tablas.**

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabla 1.</b>  | Relación entre los clones de PD-L1, el fármaco asociado, punto de corte de positividad y designación de aprobación FDA. (Adaptado de Tsao M. ASLC atlas of PD-L1 immunohistochemistry testing in lung cancer). | 18 |
| <b>Tabla 2.</b>  | Principales ensayos en monoterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón, aprobados o en vías de la aprobación FDA. (Adaptado de Herzberg B, 2017; Gong, 2018 y Caminoa-Lizarralde 2018).          | 19 |
| <b>Tabla 3.</b>  | Estadios pTNM en cáncer de pulmón, 8ª Ed (Nicholson 2018).   | 25 |
| <b>Tabla 4.</b>  | Estadios en cáncer de pulmón, 8ª Ed.   | 26 |
| <b>Tabla 5.</b>  | Opciones terapéuticas estándar actuales y novedosas (incluidos ensayos clínicos fases III en rojo y fases I/II en morado) en CPNCP (Adaptado de Ferrara R, 2018).  | 28 |
| <b>Tabla 6.</b>  | Diferentes estudios de armonización de los distintos clones de PD-L1.  | 34 |
| <b>Tabla 7.</b>  | Técnicas inmunohistoquímicas realizadas para diagnóstico y CD8.  | 44 |
| <b>Tabla 8.</b>  | VARIABLES CLÍNICAS Y ANATOMOPATOLÓGICAS. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.   | 55 |
| <b>Tabla 9.</b>  | Valores HR, Intervalo de confianza del 95% y p con respecto a SLE y SG en relación a subtipo histológico.  | 64 |
| <b>Tabla 10.</b> | Valores de PD-L1 en células tumorales en ambos observadores  | 65 |
| <b>Tabla 11.</b> | Valores de PD-L1 en células inmunes en ambos observadores.   | 65 |
| <b>Tabla 12.</b> | Valores de PD-L1 según los puntos de corte usados en los distintos ensayos clínicos, en células tumorales (TC), en ambos observadores.   | 66 |
| <b>Tabla 13.</b> | Valores de PD-L1 según los puntos de corte usados en los distintos ensayos clínicos, en células inmunes (IC), en ambos observadores  | 66 |
| <b>Tabla 14.</b> | Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en TC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos, del observador I.E. con las características clínico-patológica.                                 | 72 |
| <b>Tabla 15.</b> | Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en TC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador E.R. con las características clínico-patológicas.                                 | 73 |
| <b>Tabla 16.</b> | Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en IC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador I.E., con las características clínico-patológicas.                                | 74 |
| <b>Tabla 17.</b> | Correlación de la expresión proteica de PD-L1 en IC, considerando los puntos de corte de los ensayos clínicos del observador E.R. con las características clínico-patológicas                                  | 75 |
| <b>Tabla 18.</b> | Correlación entre la expresión media de PD-L1 con observador I.E. y el hábito tabáquico.   | 76 |
| <b>Tabla 19</b>  | . Correlación entre la expresión media de PD-L1 en TC y en IC, el tipo histológico y el hábito tabáquico.  | 77 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Tabla 20.</b> | Correlación entre la densidad de infiltrado inflamatorio peritumoral valorado con H-E y datos clínico-patológicos.   | 79 |
| <b>Tabla 21.</b> | Datos de media, mediana, SD y valor mínimo y máximo de los valores absolutos y densidad de CD8.  | 81 |
| <b>Tabla 22.</b> | Valores de CD8 según subtipos histológicos (media, mediana y SD de valores absolutos y densidad).  | 81 |
| <b>Tabla 23.</b> | Correlación entre expresión de PD-L1 en TC con ambos clones (22C3 y 28-8) valorado por observador I.E. y los CD8+ (valor absoluto y densidad).                       | 83 |
| <b>Tabla 24.</b> | Correlación entre expresión de PD-L1 en IC con ambos clones (22C3 y 28-8) valorado por observador I.E. y los CD8+ (valor absoluto y densidad).                       | 84 |
| <b>Tabla 25.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, obtenidos de un modelo de COX multivariante con los datos clínico-patológicos, de expresión de PD-L1 y CD8. | 87 |
| <b>Tabla 26.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen CDH7.  | 88 |
| <b>Tabla 27.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen WDR26.   | 88 |
| <b>Tabla 28.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen UBXN11.  | 89 |
| <b>Tabla 29.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SLE, añadiendo al modelo multivariante el gen ADIPOR1.   | 89 |
| <b>Tabla 30.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, obtenidos de un modelo de COX multivariante con los datos clínico-patológicos, de expresión de PD-L1 y CD8.  | 90 |
| <b>Tabla 31.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen NGDN.   | 90 |
| <b>Tabla 32.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen MYOD1.  | 91 |
| <b>Tabla 33.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen ADCYAP1R1.  | 91 |
| <b>Tabla 34.</b> | Datos de los factores de riesgo y de protección, en SG, añadiendo al modelo multivariante el gen CCL17.  | 91 |



## Anexo 1. Informe del Comité Ético de Investigación Clínica



### INFORME DEL COMITE ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D<sup>a</sup> Almudena Castro Conde, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

#### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del investigador Javier De Castro Carpeño del Servicio de Oncología del Hospital General del Hospital Universitario "La Paz" para que se realice el estudio titulado **"DETERMINACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA EXPRESIÓN DE PDL-1 EN CARCINOMA DE CÉLULA NO PEQUEÑA DE PULMÓN"**, Versión 1.1 de 24 abril 2016, Hoja Información Paciente/Consentimiento Informado Versión 1.1 de 24 abril 2016, código HULP: **PI-2339**

y considera que teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios de disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador Javier De Castro Carpeño del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario "La Paz" como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 2 de junio de 2016

Firmado:  
D<sup>a</sup> Almudena Castro Conde

## Anexo 2. Tabla completa de datos de la cohorte

|    | A       | B            | C                | D                 | E      | F                         | G                   | H                   | I                   | J                    | K                           | L                       | M                  |
|----|---------|--------------|------------------|-------------------|--------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1  | Nº CASO | Codigo Array | Fecha nacimiento | Fecha diagnóstico | EDADDX | sexo hombre (0) mujer (1) | Seguimiento (meses) | Exitus (si:1, no:0) | Meses hasta recaída | Recaída (si:1, no:0) | Fumador (si:1, no:0, exf:2) | TTº con QT (si:1, no:0) | Fecha inicio de QT |
| 2  | 1       | T00269669    | 03/05/1946       | 27/04/2005        | 59     | 0                         | 21                  | 1                   | 13                  | 1                    | 1                           | 1                       | 0                  |
| 3  | 2       | T00277788    | 16/09/1947       | 20/07/2005        | 58     | 1                         | 2                   | 1                   | 2                   | 0                    | 0                           | 0                       | 0                  |
| 4  | 3       | T00277790    | 04/06/1925       | 19/10/2005        | 80     | 0                         | 6                   | 1                   | 4                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 5  | 4       | T00277791    | 08/10/1927       | 16/09/2005        | 78     | 0                         | 16                  | 1                   | 16                  | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 6  | 5       | T00296883    | 03/10/1932       | 11/11/2005        | 73     | 0                         | 64                  | 1                   | 24                  | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 7  | 6       | T00296884    | 06/04/1928       | 21/11/2005        | 78     | 0                         | 11                  | 1                   | 2                   | 1                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 8  | 7       | T00296886    | 23/03/1937       | 03/08/2005        | 68     | 1                         | 23                  | 1                   | 13                  | 1                    | 0                           | 1                       | 17/09/2005         |
| 9  | 9       | T00296888    | 05/04/1942       | 12/09/2005        | 63     | 0                         | 153                 | 0                   | 153                 | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 10 | 11      | T00296892    | 01/02/1958       | 20/04/2005        | 47     | 0                         | 70                  | 0                   | 70                  | 0                    | 1                           | 1                       | 27/05/2005         |
| 11 | 12      | T00296896    | 02/10/1928       | 21/10/2005        | 77     | 0                         | 15                  | 1                   | 6                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 12 | 14      | T00305615    | 23/12/1922       | 21/12/2005        | 83     | 0                         | 16                  | 1                   | 10                  | 1                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 13 | 15      | T00305616    | 13/03/1954       | 18/01/2006        | 52     | 0                         | 136                 | 1                   | 12                  | 1                    | 0                           | 1                       | 02/03/2006         |
| 14 | 16      | T00305617    | 13/09/1942       | 16/01/2006        | 63     | 0                         | 7                   | 1                   | 5                   | 1                    | 2                           | 1                       | 17/06/2005         |
| 15 | 17      | T00305618    | 25/01/1954       | 20/01/2006        | 52     | 0                         | 11                  | 1                   | 8                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 16 | 18      | T00305619    | 10/08/1925       | 07/02/2006        | 81     | 0                         | 147                 | 0                   | 147                 | 0                    | 0                           | 0                       | 0                  |
| 17 | 19      | T00305620    | 13/05/1929       | 13/02/2006        | 77     | 0                         | 21                  | 1                   | 21                  | 0                    | 1                           | 1                       | 08/03/2006         |
| 18 | 20      | T00305621    | 09/10/1931       | 26/04/2006        | 75     | 1                         | 147                 | 0                   | 147                 | 0                    | 0                           | 1                       | 08/06/2006         |
| 19 | 21      | T00305622    | 07/02/1946       | 10/05/2006        | 60     | 0                         | 144                 | 1                   | 119                 | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 20 | 22      | T00305623    | 18/06/1941       | 07/06/2006        | 65     | 0                         | 69                  | 1                   | 31                  | 1                    | 1                           | 1                       | 28/06/2006         |
| 21 | 23      | T00305624    | 03/07/1959       | 16/06/2006        | 47     | 0                         | 37                  | 1                   | 37                  | 0                    | 2                           | 1                       | 14/06/2006         |
| 22 | 24      | T00305629    | 12/06/1944       | 23/06/2006        | 62     | 0                         | 1                   | 1                   | 1                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 23 | 25      | T00305630    | 28/08/1920       | 17/02/2006        | 86     | 0                         | 99                  | 1                   | 99                  | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 24 | 27      | T00305632    | 29/09/1958       | 17/04/2006        | 48     | 0                         | 9                   | 1                   | 6                   | 1                    | 1                           | 1                       | 01/06/2006         |
| 25 | 28      | T00305633    | 23/12/1943       | 10/03/2006        | 62     | 1                         | 148                 | 0                   | 148                 | 0                    | 2                           | 1                       | 26/04/2006         |
| 26 | 29      | T00305634    | 27/03/1931       | 31/03/2006        | 75     | 0                         | 107                 | 1                   | 107                 | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 27 | 31      | T00305636    | 26/11/1956       | 30/06/2006        | 50     | 1                         | 48                  | 1                   | 17                  | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 28 | 32      | T00305637    | 08/07/1922       | 03/07/2006        | 84     | 1                         | 142                 | 0                   | 142                 | 0                    | 0                           | 0                       | 0                  |
| 29 | 33      | T00305638    | 03/02/1957       | 10/07/2006        | 49     | 0                         | 143                 | 0                   | 143                 | 0                    | 2                           | 1                       | 01/09/2006         |
| 30 | 34      | T00305639    | 06/04/1932       | 13/09/2006        | 74     | 0                         | 91                  | 1                   | 91                  | 0                    | 2                           | 1                       | 23/10/2003         |
| 31 | 36      | T00305641    | 15/08/1943       | 20/09/2006        | 63     | 0                         | 141                 | 0                   | 141                 | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 32 | 37      | T00322398    | 16/03/1931       | 31/01/2007        | 76     | 0                         | 42                  | 1                   | 23                  | 1                    | 0                           | 1                       | 28/02/2007         |
| 33 | 38      | T00324771    | 20/02/1951       | 20/11/2006        | 56     | 0                         | 28                  | 1                   | 15                  | 1                    | 1                           | 1                       | 01/02/2007         |
| 34 | 39      | T00324773    | 14/09/1934       | 18/12/2006        | 72     | 0                         | 42                  | 1                   | 30                  | 1                    | 1                           | 1                       | 12/02/2007         |
| 35 | 40      | T00324774    | 31/01/1956       | 27/12/2006        | 51     | 0                         | 12                  | 1                   | 12                  | 0                    |                             | 1                       | 22/02/2007         |
| 36 | 41      | T00324775    | 22/08/1946       | 19/01/2007        | 60     | 0                         | 7                   | 1                   | 7                   | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 37 | 42      | T00324776    | 28/02/1946       | 22/01/2007        | 61     | 0                         | 96                  | 0                   | 96                  | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 38 | 43      | T00324785    | 19/09/1953       | 23/08/2006        | 53     | 0                         | 130                 | 0                   | 130                 | 0                    | 1                           | 1                       | 18/10/2006         |
| 39 | 44      | T00324786    | 28/01/1936       | 09/08/2006        | 71     | 0                         | 57                  | 1                   | 57                  | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 40 | 45      | T00324788    | 05/01/1944       | 02/10/2006        | 63     | 0                         | 2                   | 1                   | 2                   | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 41 | 46      | T00324789    | 13/01/1934       | 03/03/2006        | 72     | 0                         | 145                 | 0                   | 145                 | 0                    | 2                           | 1                       | 03/05/2006         |
| 42 | 47      | T00324790    | 12/07/1947       | 12/07/2006        | 59     | 0                         | 32                  | 1                   | 32                  | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 43 | 50      | T00335080    | 01/03/1937       | 17/06/2007        | 70     | 0                         | 20                  | 1                   | 0                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 44 | 52      | T00335082    | 15/04/1934       | 28/06/2007        | 73     | 0                         | 32                  | 1                   | 22                  | 1                    | 2                           | 1                       | 17/08/2007         |
| 45 | 53      | T00335084    | 30/03/1931       | 05/02/2007        | 76     | 1                         | 132                 | 0                   | 132                 | 0                    | 0                           | 0                       | 0                  |
| 46 | 54      | T00335085    | 06/06/1944       | 09/02/2007        | 63     | 0                         | 137                 | 0                   | 137                 | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 47 | 55      | T00335086    | 24/08/1946       | 10/04/2007        | 61     | 1                         | 82                  | 1                   | 10                  | 1                    | 1                           | 1                       | 04/06/2007         |
| 48 | 56      | T00338233    | 13/02/1940       | 29/01/2007        | 67     | 0                         | 67                  | 1                   | 8                   | 1                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 49 | 57      | T00338529    | 18/09/1932       | 23/04/2007        | 75     | 0                         | 1                   | 1                   | 1                   | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 50 | 58      | T00338531    | 30/06/1931       | 04/05/2007        | 76     | 0                         | 2                   | 1                   | 2                   | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |
| 51 | 59      | T00338532    | 05/08/1947       | 25/05/2007        | 60     | 0                         | 27                  | 1                   | 12                  | 1                    | 2                           | 1                       | 24/07/2007         |
| 52 | 60      | T00338533    | 06/10/1944       | 04/06/2007        | 63     | 0                         | 16                  | 1                   | 7                   | 1                    | 1                           | 1                       | 20/07/2007         |
| 53 | 61      | T00338654    | 07/05/1928       | 19/10/2007        | 80     | 0                         | 110                 | 1                   | 110                 | 0                    | 2                           | 0                       | 0                  |
| 54 | 62      | T00338655    | 12/09/1931       | 22/10/2007        | 76     | 0                         | 125                 | 0                   | 125                 | 0                    | 1                           | 0                       | 0                  |

|    | N       | O                               | P   | Q   | R               | S            | T                      | U                  | V                | W             | X              | Y             |
|----|---------|---------------------------------|---|---|-----------------|--------------|------------------------|--------------------|------------------|---------------|----------------|---------------|
| 1  | Nº CASO | Tto QT                          | 1L, 2L, 3L  | Otros tumores                                     | Tipo de cirugía | Localizacion | ESTADIO 8º Ed Revisado | TNM 8º Ed revisado | N 8º Ed revisado | Tamaño T (cm) | PLEURA + (1/2) | DGTO WHO 2015 |
| 2  | 1       |                                 |   |   | lobectomia      | LII          | 2b                     | T1c                | n1               | 2.7           | NEG            | CE            |
| 3  | 2       |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2a                | n1               | 3             | POS            | AD            |
| 4  | 3       |                                 |   |   | neumonectomia   |              | 3b                     | T4                 | n1               | 10            | NEG            | CE            |
| 5  | 4       |                                 |   |   | lobectomia      | LSD          | 1b                     | T2a                | n0               | 2.8           | POS            | AD            |
| 6  | 5       |                                 | 1L cispla+docetax, 2L tarceva, 3L alimta                |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2a                | n1               | 4             | NEG            | CE            |
| 7  | 6       |                                 | 1L docetaxel  |   | lobectomia      | LID          | 2b                     | T3                 | n0               | 6             | NEG            | CE            |
| 8  | 7       | paclitaxel-carboplatino         | 2L erlotinib, 3L docetaxel                              |   | neumonectomia   | ND           | 3a                     | T2b                | n2               | 5             | NEG            | AD            |
| 9  | 9       |                                 |   |   | lobectomia      | LSD          | 2b                     | T3                 | n0               | 6             | NEG            | AD            |
| 10 | 11      | carbotaxol                      |   |   | lobectomia      | LSD          | 2a                     | T2b                | n0               | 5             | NEG            | AD            |
| 11 | 12      |                                 | 1L cispla+genta, 2L erlotinib                           | 1L cispla+genta; 2L erlotinib                     | lobectomia      | LSD          | 2b                     | T3                 | n0               | 7             | POS            | CE            |
| 12 | 14      |                                 |   | ca prostata                                       | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2b                | n1               | 5             | NEG            | adenoescomoso |
| 13 | 15      | carbotaxol                      |   |   | neumonectomia   | NI           | 3a                     | T4                 | n0               | 15            | NEG            | AD            |
| 14 | 16      | cispla-gemcita-vinorel (NEOADY) | Qtneoadyuvante cispl+gemcita+vinorel, qx, carbo+docetal |   | lobectomia      | LSD          | 3b                     | T4                 | n2               | 7.5           | POS            | CE            |
| 15 | 17      |                                 |   | ca amigdala 2002 T4N2bM0                          | lobectomia      | LSD y LM     | 1b                     | T2a                | n0               | 4             | NEG            | CE            |
| 16 | 18      |                                 |   |   | lobectomia      | LID          | 2b                     | T3                 | n0               | 6             | NEG            | AD            |
| 17 | 19      | carboplatino + paquitaxol       |   | ca urotelial recaida con mts el 16-11-2007        | lobectomia      | LSI          | 3a                     | T4                 | n0               | 9             | NEG            | CE            |
| 18 | 20      | cispla-vinorel                  |   |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2b                | n1               | 5             | NEG            | AD            |
| 19 | 21      |                                 | 1L pl+vinorel   |   | neumonectomia   | NI           | 3a                     | T3                 | n1               | 5.5           | POS            | CE            |
| 20 | 22      | cispla-vinorel                  |   |   | lobectomia      | LM           | 3a                     | T2a                | n2               | 4             | NEG            | AD            |
| 21 | 23      | cispla-vinorel                  |   |   | neumonectomia   | ND           | 3b                     | T4                 | n2               | 9             | NEG            | AD            |
| 22 | 24      |                                 |   |   | neumonectomia   | NI           | 3a                     | T4                 | n1               | 10            | NEG            | CE            |
| 23 | 25      |                                 |   |   | segmentectomia  | seg ant LSD  | 1a3                    | T1c                | n0               | 2.3           | NEG            | CE            |
| 24 | 27      | cispla-gemcita                  | 2L docetaxel  |   | neumonectomia   | NI           | 3a                     | T4                 | n1               | 8             | NEG            | CE            |
| 25 | 28      | cispla-vinorel                  |   | ca mama 21-12-2017                                | lobectomia      | LSI          | 3b                     | T4                 | n2               | 7.5           | NEG            | AD            |
| 26 | 29      |                                 |   |   | lobectomia      | LSD          | 1b                     | T2a                | n0               | 3.5           | NEG            | CE            |
| 27 | 31      |                                 | 1L cisplat+vinorel                                      |   | lobectomia      | LSD y LM     | 1b                     | T2a                | n0               | 3             | POS            | AD            |
| 28 | 32      |                                 |   |   | lobectomia      | LSD          | 1a3                    | T1c                | n0               | 3             | NEG            | AD            |
| 29 | 33      | cispla-vinorel                  |   |   | lobectomia      | LII          | 1a3                    | T1c                | n0               | 3             | NEG            | AD            |
| 30 | 34      | cispla-vinorel                  |   | vejiga mts del urotelial no recaida del pulmon    | neumonectomia   | ND           | 3a                     | T3                 | n1               | 6             | POS            | CE            |
| 31 | 36      |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T3                 | n0               | 7             | NEG            | CE            |
| 32 | 37      | cispla-vinorel                  | 2L tarceva  |   | lobectomia      | LSD y LM     | 3a                     | T2a                | n2               | 3             | POS            | AD            |
| 33 | 38      | cispla-vinorel                  | 1L mts alimta (IV 12-2-2009)                            |   | lobectomia      | LSI          | 3a                     | T2a                | n2               | 3             | POS            | AD            |
| 34 | 39      | platino-vinorel                 | 2L cispla+docetaxel+rt                                  |   | lobectomia      | LSD          | 1b                     | T2a                | n0               | 3             | POS            | CE            |
| 35 | 40      | cispla-vinorel                  |   | estadio IV inicial?                               | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2a                | n1               | 4             | POS            | AD            |
| 36 | 41      |                                 |   |   | lobectomia      | LID          | 3b                     | T4                 | n2               | 10            | POS            | CE            |
| 37 | 42      |                                 |   |   | neumonectomia   | ND           | 2b                     | T3                 | n0               | 7             | NEG            | CE            |
| 38 | 43      | cispl-vinorel                   |   |   | lobectomia      | LSI          | 3a                     | T4                 | n0               | 13            | NEG            | AD            |
| 39 | 44      |                                 |   | adenoca intramuco colon exitus por qx eventracion | lobectomia      | LSD          | 1a3                    | T1c                | n0               | 2.5           | NEG            | AD            |
| 40 | 45      |                                 |   |   | neumonectomia   | NI           | 2b                     | T1c                | n1               | 2.8           | NEG            | CE            |
| 41 | 46      | cispla-vinorel                  |   | 1   | lobectomia      | LII          | 2a                     | T2b                | n0               | 5             | POS            | AD            |
| 42 | 47      |                                 |   | LNH c grande ori y ca epid orofaringe             | lobectomia      | LII          | 1a2                    | T1b                | n0               | 1.5           | NEG            | AD            |
| 43 | 50      |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2a                | n1               | 3.5           | NEG            | AD            |
| 44 | 52      | cispla-vinorel                  |   |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T2a                | n1               | 4             | POS            | CE            |
| 45 | 53      |                                 |   |   | lobectomia      | LSD          | 2a                     | T2b                | n0               | 5             | NEG            | AD            |
| 46 | 54      |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 1a2                    | T1b                | n0               | 1.4           | NEG            | AD            |
| 47 | 55      | cispla-vinorel                  |   |   | neumonectomia   | ND           | 3a                     | T2a                | n2               | 4             | NEG            | AD            |
| 48 | 56      |                                 | cisplat+docetaxel (11-6-2008)                           |   | lobectomia      | LSI          | 2b                     | T3                 | n0               | 7             | NEG            | CE            |
| 49 | 57      |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 3a                     | T2a                | n2               | 3.5           | NEG            | CE            |
| 50 | 58      |                                 |   |   | lobectomia      | LSD y LM     | 2b                     | T2a                | n1               | 4             | NEG            | CE            |
| 51 | 59      | cispla-vinorel                  |   |   | neumonectomia   | ND           | 2b                     | T1c                | n1               | 3             | NEG            | CE            |
| 52 | 60      | cispla-vinorel                  |   |   | neumonectomia   | NI           | 3a                     | T4                 | n1               | 11            | NEG            | CE            |
| 53 | 61      |                                 |   |   | lobectomia      | LII          | 3a                     | T4                 | n0               | 16            | NEG            | AD            |
| 54 | 62      |                                 |   |   | lobectomia      | LSI          | 1a2                    | T1b                | n0               | 1.7           | NEG            | CE            |

Apéndice y anexos

|    | Z       | AA          | AB    | AC   | AD         | AE               | AF     | AG         | AH          | AI     | AJ           | AK    | AL                            |
|----|---------|-------------|-------|--|------------|------------------|--------|------------|-------------|--------|--------------|-------|-------------------------------|
| 1  | Nº CASO | CRITERIO G3 | GRADO | CE queratinizante (Q)/no queratinizante (NQ) | P solido % | P micropapilar % | G3 (%) | P acinar % | P papilar % | G2 (%) | P lepidico % | G1(%) | Lepidico mucinoso/no mucinoso |
| 2  | 1       | 0           | G2    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 3  | 2       | 0           |       |  | 0          | 10               | 10     | 90         | 0           | 90     | 0            | 0     | NMC                           |
| 4  | 3       | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 5  | 4       | 1           |       | NQ   | 75         | 0                | 75     | 25         | 0           | 25     | 0            | 0     | NMC                           |
| 6  | 5       | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 7  | 6       | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 8  | 7       | 0           |       |  | 0          | 30               | 30     | 30         | 40          | 70     | 0            | 0     | NMC                           |
| 9  | 9       | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 100        | 0           | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 10 | 11      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 100        | 0           | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 11 | 12      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 12 | 14      | 1           | G3    | NQ   | 0          | 0                | 0      | 100        | 0           | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 13 | 15      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 10         | 0           | 10     | 90           | 90    | MC                            |
| 14 | 16      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 15 | 17      | 0           | G2    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 16 | 18      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 25         | 0           | 25     | 75           | 75    | MC                            |
| 17 | 19      | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 18 | 20      | 0           |       |  | 10         | 10               | 20     | 80         | 0           | 80     | 0            | 0     | NMC                           |
| 19 | 21      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 20 | 22      | 1           |       |  | 50         | 50               | 100    | 0          | 0           | 0      | 0            | 0     | NMC                           |
| 21 | 23      | 1           |       |  | 90         | 0                | 90     | 10         | 0           | 10     | 0            | 0     | NMC                           |
| 22 | 24      | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       | 0                             |
| 23 | 25      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 24 | 27      | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 25 | 28      | 1           |       |  | 100        | 0                | 100    | 0          | 0           | 0      | 0            | 0     | NMC                           |
| 26 | 29      | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 27 | 31      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 60         | 40          | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 28 | 32      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 15         | 70          | 85     | 15           | 15    | NMC                           |
| 29 | 33      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 10         | 90          | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 30 | 34      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 31 | 36      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 32 | 37      | 0           |       |  | 0          | 20               | 20     | 60         | 20          | 80     | 0            | 0     | NMC                           |
| 33 | 38      | 1           |       |  | 90         | 1                | 91     | 9          | 0           | 9      | 0            | 0     | NMC                           |
| 34 | 39      | 0           | G2    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 35 | 40      | 1           |       |  | 50         | 0                | 50     | 50         | 0           | 50     | 0            | 0     | NMC                           |
| 36 | 41      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 37 | 42      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 38 | 43      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 40         | 0           | 40     | 60           | 60    | MC                            |
| 39 | 44      | 1           |       |  | 100        | 0                | 100    | 0          | 0           | 0      | 0            | 0     | NMC                           |
| 40 | 45      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 41 | 46      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 90         | 10          | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 42 | 47      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 90         | 10          | 100    | 0            | 0     | MC                            |
| 43 | 50      | 1           |       |  | 100        | 0                | 100    | 0          | 0           | 0      | 0            | 0     | NMC                           |
| 44 | 52      | 1           | G3    | NQ   |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 45 | 53      | 0           |       |  | 40         | 0                | 40     | 60         | 0           | 60     | 0            | 0     | NMC                           |
| 46 | 54      | 0           |       |  | 0          | 0                | 0      | 100        | 0           | 100    | 0            | 0     | NMC                           |
| 47 | 55      | 0           |       |  | 0          | 5                | 5      | 40         | 40          | 80     | 15           | 15    | MC                            |
| 48 | 56      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 49 | 57      | 0           | G2    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 50 | 58      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 51 | 59      | 0           | G2    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 52 | 60      | 0           | G2    | MIXTO (CE no queratinizante CON NEUROENDOCR) |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |
| 53 | 61      | 0           |       |  | 0          | 5                | 5      | 5          | 90          | 95     | 0            | 0     | NMC                           |
| 54 | 62      | 1           | G3    | Q  |            |                  |        |            |             |        |              |       |                               |

|    | AM      | AN                 | AO  | AP        | AQ        | AR                    | AS        | AT                  | AU             | AV             | AW                         | AX             | AY                       |
|----|---------|--------------------|---|-----------|-----------|-----------------------|-----------|---------------------|----------------|----------------|----------------------------|----------------|--------------------------|
| 1  | Nº CASO | P otros CRIBIFORME | Inflamacion (brambilla); Intenso(1)/No intenso (NI) | 22C3 (TC) | 22C3 (TC) | 22c3 (TC) (0/1/2/3/4) | 22C3 (IC) | 22C3 (IC) (0/1/2/3) | 22C3 (TC) E.R. | 22C3 (TC) E.R. | 22C3 (TC) E.R. (0/1/2/3/4) | 22C3 (IC) E.R. | 22C3 (IC) E.R. (0/1/2/3) |
| 2  | 1       |                    | NI  | 20        | 20        | 2                     | 0         | 0                   | 60             | 60             | 4                          | 0              | 0                        |
| 3  | 2       |                    | NI  | <1        | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 5              | 2                        |
| 4  | 3       |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 5  | 4       | 25                 | I   | 80        | 80        | 4                     | 0         | 0                   | 95             | 95             | 4                          | 0              | 0                        |
| 6  | 5       |                    | NI  | 30        | 30        | 3                     | 1         | 1                   | 35             | 35             | 3                          | 0              | 0                        |
| 7  | 6       |                    | NI  | 90        | 90        | 4                     | 0         | 0                   | 85             | 85             | 4                          | 0              | 0                        |
| 8  | 7       | 1                  | I   | 5         | 5         | 2                     | 10        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 9  | 9       | 50                 | NI  | <1        | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 1              | 1                        |
| 10 | 11      | 100                | I   | <1        | 0         | 0                     | 10        | 3                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 11 | 12      |                    | NI  | 80        | 80        | 4                     | 1         | 1                   | 80             | 80             | 4                          | 0              | 0                        |
| 12 | 14      |                    | NI  | <1        | 0         | 0                     | 1         | 1                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 13 | 15      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 60             | 60             | 4                          | 0              | 0                        |
| 14 | 16      |                    | NI  | 80        | 80        | 4                     | 0         | 0                   | 80             | 80             | 4                          | 5              | 2                        |
| 15 | 17      |                    | NI  | <1        | 0         | 0                     | 5         | 2                   | <1             | 0              | 0                          | 1              | 1                        |
| 16 | 18      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 17 | 19      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 18 | 20      |                    | I   | 1         | 1         | 1                     | 1         | 1                   | 20             | 20             | 2                          | 5              | 2                        |
| 19 | 21      |                    | NI  | 90        | 90        | 4                     | 0         | 0                   | 80             | 80             | 4                          | 1              | 1                        |
| 20 | 22      |                    | I   | 75        | 75        | 4                     | 5         | 2                   | 60             | 60             | 4                          | 1              | 1                        |
| 21 | 23      |                    | NI  | 80        | 80        | 4                     | 1         | 1                   | 60             | 60             | 4                          | 1              | 1                        |
| 22 | 24      |                    | NI  | 10        | 10        | 2                     | 0         | 0                   | 25             | 25             | 3                          | 0              | 0                        |
| 23 | 25      |                    | NI  | 75        | 75        | 4                     | 11        | 3                   | 60             | 60             | 4                          | 0              | 0                        |
| 24 | 27      |                    | NI  | 1         | 1         | 1                     | 1         | 1                   | 1              | 1              | 1                          | 5              | 2                        |
| 25 | 28      |                    | I   | 95        | 95        | 4                     | 1         | 1                   | 85             | 85             | 4                          | 0              | 0                        |
| 26 | 29      |                    | I   | 0         | 0         | 0                     | 11        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 10             | 3                        |
| 27 | 31      |                    | I   | 0         | 0         | 0                     | 3         | 1                   | 0              | 0              | 0                          | 5              | 2                        |
| 28 | 32      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 3         | 1                   | 0              | 0              | 0                          | 1              | 1                        |
| 29 | 33      |                    | I   | 0         | 0         | 0                     | 5         | 2                   | 0              | 0              | 0                          | 1              | 1                        |
| 30 | 34      |                    | NI  | 20        | 20        | 2                     | 5         | 2                   | 20             | 20             | 2                          | 10             | 3                        |
| 31 | 36      |                    | NI  | 5         | 5         | 2                     | 3         | 1                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 32 | 37      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 33 | 38      | 90                 | NI  | 70        | 70        | 4                     | 3         | 1                   | 60             | 60             | 4                          | 1              | 1                        |
| 34 | 39      |                    | NI  | <1        | 0         | 0                     | 3         | 1                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 35 | 40      | 50                 | NI  | 5         | 5         | 2                     | 0         | 0                   | 1              | 1              | 2                          | 0              | 0                        |
| 36 | 41      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 5         | 2                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 37 | 42      |                    | NI  | 90        | 90        | 4                     | 3         | 1                   | 90             | 90             | 4                          | 0              | 0                        |
| 38 | 43      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 0         | 0                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 39 | 44      | SARCOMATOID        | NI  | 80        | 80        | 4                     | 3         | 1                   | 85             | 85             | 4                          | 5              | 2                        |
| 40 | 45      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 5         | 2                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 41 | 46      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 5         | 2                   | 0              | 0              | 0                          | 5              | 2                        |
| 42 | 47      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 10        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 10             | 3                        |
| 43 | 50      |                    | NI  | 1         | 1         | 1                     | 10        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 44 | 52      |                    | I   | 0         | 0         | 0                     | 10        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 10             | 3                        |
| 45 | 53      | 50                 | NI  | 0         | 0         | 0                     | 2         | 1                   | 0              | 0              | 0                          | 1              | 1                        |
| 46 | 54      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 5         | 2                   | <1             | 0              | 0                          | 10             | 3                        |
| 47 | 55      |                    | NI  | 0         | 0         | 0                     | 1         | 1                   | 0              | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 48 | 56      |                    | NI  | 1         | 1         | 1                     | 3         | 2                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 49 | 57      |                    | NI  | 2         | 2         | 1                     | 1         | 1                   | 1              | 1              | 1                          | 0              | 0                        |
| 50 | 58      |                    | I   | 0         | 0         | 0                     | 10        | 3                   | <1             | 0              | 0                          | 10             | 3                        |
| 51 | 59      |                    | NI  | 30        | 30        | 3                     | 10        | 3                   | 20             | 20             | 2                          | 20             | 3                        |
| 52 | 60      |                    | NI  | 75        | 75        | 4                     | 0         | 0                   | 5              | 5              | 2                          | 15             | 3                        |
| 53 | 61      |                    | NI  | 1         | 1         | 2                     | 0         | 0                   | <1             | 0              | 0                          | 0              | 0                        |
| 54 | 62      |                    | I   | 75        | 75        | 4                     | 1         | 1                   | 70             | 70             | 4                          | 0              | 0                        |

Apéndice y anexos

|    | AZ      | BA        | BB        | BC                       | BD        | BE                     | BF                | BG                | BH                               | BI                | BJ                             | BK          | BL            |
|----|---------|-----------|-----------|--------------------------|-----------|------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------|---------------|
| 1  | Nº CASO | 28-8 (TC) | 28-8 (TC) | 28-8 (TC)<br>(0/1/2/3/4) | 28-8 (IC) | 28-8 (IC)<br>(0/1/2/3) | 28-8 (TC)<br>E.R. | 28-8 (TC)<br>E.R. | 28-8 (TC)<br>E.R.<br>(0/1/2/3/4) | 28-8 (IC)<br>E.R. | 28-8 (IC)<br>E.R.<br>(0/1/2/3) | Heterogéneo | NECROSIS<br>% |
| 2  | 1       | 20        | 20        | 2                        | 0         | 0                      | 40                | 40                | 3                                | 10                | 3                              | mosaico     | 40%           |
| 3  | 2       | <1        | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 1                 | 1                              | no          |               |
| 4  | 3       | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 5                 | 2                              | no          |               |
| 5  | 4       | 80        | 80        | 4                        | 0         | 0                      | 90                | 90                | 4                                | 5                 | 2                              | no          |               |
| 6  | 5       | 20        | 20        | 2                        | 1         | 1                      | 40                | 40                | 3                                | 1                 | 1                              | mosaico     |               |
| 7  | 6       | 80        | 80        | 4                        | 0         | 0                      | 95                | 95                | 4                                | 0                 | 0                              | no          | 80%           |
| 8  | 7       | 5         | 5         | 2                        | 10        | 3                      | 10                | 10                | 2                                | 0                 | 0                              | mosaico     |               |
| 9  | 9       | 1         | 1         | 1                        | 1         | 1                      | 0                 | 0                 | 0                                | 1                 | 1                              | no          |               |
| 10 | 11      | <1        | 0         | 0                        | 10        | 3                      | 0                 | 0                 | 0                                | 1                 | 1                              | no          | 50%           |
| 11 | 12      | 75        | 75        | 4                        | 1         | 1                      | 80                | 80                | 4                                | 1                 | 1                              | mosaico     |               |
| 12 | 14      | 2         | 2         | 1                        | 1         | 1                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 13 | 15      | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 5                 | 5                 | 2                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 14 | 16      | 90        | 90        | 4                        | 0         | 0                      | 80                | 80                | 4                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 15 | 17      | <1        | 0         | 0                        | 5         | 2                      | <1                | 0                 | 0                                | 10                | 3                              | no          |               |
| 16 | 18      | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 17 | 19      | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 18 | 20      | 20        | 20        | 2                        | 5         | 2                      | 10                | 10                | 2                                | 10                | 3                              | geografica  |               |
| 19 | 21      | 90        | 90        | 4                        | 3         | 1                      | 80                | 80                | 4                                | 0                 | 0                              | no          | 20%           |
| 20 | 22      | 75        | 75        | 4                        | 5         | 2                      | 60                | 60                | 4                                | 5                 | 2                              | geografica  |               |
| 21 | 23      | 80        | 80        | 4                        | 3         | 1                      | 70                | 70                | 4                                | 1                 | 1                              | mosaico     |               |
| 22 | 24      | 20        | 20        | 2                        | 0         | 0                      | 40                | 40                | 3                                | 1                 | 1                              | geografica  | 25%           |
| 23 | 25      | 75        | 75        | 4                        | 11        | 3                      | 60                | 60                | 4                                | 5                 | 2                              | geografica  |               |
| 24 | 27      | 1         | 1         | 1                        | 3         | 1                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | geografica  | 20%           |
| 25 | 28      | 95        | 95        | 4                        | 3         | 1                      | 90                | 90                | 4                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 26 | 29      | <1        | 0         | 0                        | 11        | 3                      | 1                 | 1                 | 1                                | 0                 | 0                              | no          | 50            |
| 27 | 31      | <1        | 0         | 0                        | 1         | 1                      | <1                | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 28 | 32      | 0         | 0         | 0                        | 1         | 1                      | 0                 | 0                 | 0                                | 1                 | 1                              | no          |               |
| 29 | 33      | 0         | 0         | 0                        | 7         | 2                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 30 | 34      | 20        | 20        | 2                        | 4         | 2                      | 20                | 20                | 2                                | 10                | 3                              | mosaico     |               |
| 31 | 36      | 2         | 2         | 1                        | 10        | 3                      | 1                 | 1                 | 1                                | 10                | 3                              | mosaico     |               |
| 32 | 37      | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 33 | 38      | 80        | 80        | 4                        | 2         | 1                      | 50                | 50                | 4                                | 10                | 3                              | mosaico     |               |
| 34 | 39      | <1        | 0         | 0                        | 2         | 1                      | <1                | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          | 20            |
| 35 | 40      | 5         | 5         | 2                        | 0         | 0                      | 5                 | 5                 | 2                                | 0                 | 0                              | mosaico     |               |
| 36 | 41      | 0         | 0         | 0                        | 5         | 2                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 37 | 42      | 85        | 85        | 4                        | 4         | 1                      | 80                | 80                | 4                                | 5                 | 2                              | no          |               |
| 38 | 43      | <1        | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 39 | 44      | 90        | 90        | 4                        | 4         | 1                      | 80                | 80                | 4                                | 0                 | 0                              | mosaico     |               |
| 40 | 45      | <1        | 0         | 0                        | 5         | 2                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | geografica  |               |
| 41 | 46      | 0         | 0         | 0                        | 7         | 2                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 42 | 47      | <1        | 0         | 0                        | 10        | 3                      | <1                | 0                 | 0                                | 10                | 3                              | no          |               |
| 43 | 50      | 1         | 1         | 1                        | 10        | 3                      | <1                | 0                 | 0                                | 10                | 3                              | mosaico     |               |
| 44 | 52      | 3         | 3         | 1                        | 10        | 3                      | 2                 | 2                 | 1                                | 10                | 3                              | no          |               |
| 45 | 53      | 0         | 0         | 0                        | 3         | 1                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          | 30            |
| 46 | 54      | 0         | 0         | 0                        | 5         | 2                      | <1                | 0                 | 0                                | 5                 | 2                              | no          |               |
| 47 | 55      | 0         | 0         | 0                        | 0         | 0                      | 0                 | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 48 | 56      | 1         | 1         | 1                        | 4         | 1                      | <1                | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | mosaico     |               |
| 49 | 57      | 2         | 2         | 1                        | 1         | 1                      | 40                | 40                | 3                                | 5                 | 2                              | no          |               |
| 50 | 58      | 5         | 5         | 2                        | 10        | 3                      | 10                | 10                | 2                                | 0                 | 0                              | no          | 40            |
| 51 | 59      | 40        | 40        | 3                        | 10        | 3                      | 30                | 30                | 3                                | 5                 | 2                              | geografica  |               |
| 52 | 60      | 75        | 75        | 4                        | 0         | 0                      | 15                | 15                | 2                                | 5                 | 2                              | geografica  | 40            |
| 53 | 61      | 2         | 2         | 1                        | 0         | 0                      | <1                | 0                 | 0                                | 0                 | 0                              | no          |               |
| 54 | 62      | 90        | 90        | 4                        | 1         | 1                      | 70                | 70                | 4                                | 5                 | 2                              | mosaico     |               |

|    | BM      | BN                | BO                       | BP         | BQ     | BR      | BS    | BT        | BU  | BV         | BW      | BX      | BY      | BZ     |
|----|---------|-------------------|--------------------------|------------|--------|---------|-------|-----------|-----|------------|---------|---------|---------|--------|
| 1  | Nº CASO | Nº MITOSIS/10 CGA | Mitosis atípicas (si/no) | PLEURA +/- | GL +/- | NGANGL+ | TOTAL | Nº GL +   | LIV | PERINEURAL | PD-L1   | EGFR    | ROS1    | ALK    |
| 2  | 1       | 25                | si                       | NEG        | POS    |         | 1     | 7 1 D 7   | NO  | NO         | 0.2781  | 1.9462  | 0.3490  | 0.6913 |
| 3  | 2       | 4                 | no                       | POS        | POS    |         | 1     | 6 1 D 6   | NO  | NO         | 0.9817  |         | 2.4567  | 0.0070 |
| 4  | 3       | 38                | no                       | NEG        | POS    |         | 2     | 18 2 D 18 | NO  | NO         | 5.3956  | 1.2457  | 0.4404  | 2.5634 |
| 5  | 4       | 3                 | si                       | POS        | NEG    |         | 0     | 7 0 D 7   | NO  | NO         | 0.7116  | 0.3473  | 0.7566  | 0.1445 |
| 6  | 5       | 22                | si                       | NEG        | POS    |         | 1     | 6 1 D 6   | NO  | NO         | 0.3739  | 1.6644  | 0.5039  | 1.9728 |
| 7  | 6       | 10                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 11 0 D 11 | NO  | NO         | 1.3690  | 6.4349  | 0.6629  | 1.4108 |
| 8  | 7       | 1                 | no                       | NEG        | POS    |         | 8     | 16 8 D 16 | NO  | NO         | -0.1961 | 1.1915  | 0.6687  | 2.6505 |
| 9  | 9       | 25                | si                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 12 0 D 12 | NO  | NO         | 1.6178  | 0.0686  | 0.7486  | 4.6122 |
| 10 | 11      | 22                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 12 0 D 12 | NO  | NO         | 0.4568  | 0.5906  | 0.2602  | 1.5738 |
| 11 | 12      | 37                | si                       | POS        | NEG    |         | 0     | 20 0 D 20 | NO  | NO         | -0.0323 | 1.0253  | 0.8993  | 0.5602 |
| 12 | 14      | 1                 | no                       | NEG        | POS    |         | 2     | 20 2 D 20 | NO  | NO         | 0.1352  | 1.4675  | 0.7422  | 1.2890 |
| 13 | 15      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 12 0 D 12 | NO  | NO         | 0.1063  | 1.1522  | 0.9350  | 2.4709 |
| 14 | 16      | 8                 | si                       | POS        | POS    |         | 2     | 14 2 D 14 | NO  | NO         | -0.6598 | 1.4577  | 0.3671  | 1.4896 |
| 15 | 17      | 35                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 10 0 D 10 | NO  | NO         | 0.2399  | 1.9804  | 0.5359  | 1.6627 |
| 16 | 18      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 10 0 D 10 | NO  | NO         | 0.4972  | 2.3353  | 0.7779  | 1.0295 |
| 17 | 19      | 27                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 17 0 D 17 | NO  | NO         | 0.0961  | 3.0565  | 0.2950  | 1.3361 |
| 18 | 20      | 1                 | no                       | NEG        | POS    |         | 8     | 10 8 D 10 | NO  | NO         | 0.5380  | 4.8181  | 2.2503  | 2.0088 |
| 19 | 21      | 7                 | no                       | POS        | POS    |         | 2     | 24 2 D 24 | NO  | NO         | 0.4454  | 0.9954  | 1.0765  | 2.2061 |
| 20 | 22      | 5                 | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 35 1 D 35 | NO  | NO         | 0.4930  | 1.0933  | 2.2148  | 1.0710 |
| 21 | 23      | 9                 | no                       | NEG        | POS    |         | 4     | 17 4 D 17 | NO  | NO         | 0.3698  | 3.0758  | 1.8745  | 1.0874 |
| 22 | 24      | 8                 | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 18 1 D 18 | NO  | NO         | 1.8872  | 11.7039 | 0.8330  | 1.6969 |
| 23 | 25      | 13                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 3 0 D 3   | SI  | NO         | 0.0893  | 1.2133  | 0.2914  | 0.8559 |
| 24 | 27      | 27                | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 6 1 D 6   | SI  | NO         | 1.8249  | 0.1178  | 0.6261  | 1.5640 |
| 25 | 28      | 3                 | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 28 1 D 28 | NO  | NO         | 0.1963  | 1.1113  | 0.6151  | 0.9360 |
| 26 | 29      | 45                | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 13 0 D 13 | NO  | NO         | 0.1813  | 2.2830  | -0.0421 | 1.6350 |
| 27 | 31      | 0                 | no                       | POS        | NEG    |         | 0     | 14 0 D 14 | NO  | NO         | 0.4278  | 0.9723  | 0.3803  | 2.4463 |
| 28 | 32      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 10 0 D 10 | NO  | NO         | 0.3047  | 2.6440  | 2.9315  | 1.8365 |
| 29 | 33      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 4 0 D 4   | NO  | NO         | 0.1343  | 0.5890  | 1.0595  | 1.8486 |
| 30 | 34      | 10                | no                       | POS        | POS    |         | 1     | 11 1 D 11 | SI  | SI         | 0.5817  | 1.2566  | 0.5562  | 1.3956 |
| 31 | 36      | 23                | si                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 26 0 D 26 | NO  | NO         | 1.5785  | 1.6601  | 2.0502  | 1.0193 |
| 32 | 37      | 2                 | no                       | POS        | POS    |         | 8     | 9 8 D 9   | SI  | NO         | 0.7034  | 0.4027  | 1.1290  | 5.4872 |
| 33 | 38      | 8                 | si                       | POS        | POS    |         | 2     | 13 2 D 13 | NO  | NO         | 0.4585  | 3.1438  | 0.9011  | 0.8234 |
| 34 | 39      | 12                | si                       | POS        | NEG    |         | 0     | 4 0 D 4   | NO  | NO         | 0.0542  | 1.2182  | 0.7284  | 0.7506 |
| 35 | 40      | 11                | no                       | POS        | POS    |         | 4     | 14 4 D 14 | NO  | NO         | 0.2317  | 3.1467  | 0.7272  | 1.0446 |
| 36 | 41      | 37                | si                       | POS        | POS    |         | 7     | 12 7 D 12 | SI  | NO         | 0.4309  | 4.6939  | 0.2044  | 0.5528 |
| 37 | 42      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 14 0 D 14 | NO  | NO         | 0.4541  | 2.8114  | 0.3480  | 0.5171 |
| 38 | 43      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 7 0 D 7   | NO  | NO         | 0.2561  | 0.9915  | 0.6987  | 0.7673 |
| 39 | 44      | 7                 | si                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 6 0 D 6   | NO  | NO         | 0.4902  | 0.9686  | 0.8164  |        |
| 40 | 45      | 6                 | si                       | NEG        | POS    |         | 3     | 23 3 D 23 | NO  | SI         | -0.2300 | 1.0777  | 0.2864  | 0.8304 |
| 41 | 46      | 6                 | si                       | POS        | NEG    |         | 0     | 10 0 D 10 | NO  | NO         | 0.3106  | 1.3965  | 1.2907  | 1.6438 |
| 42 | 47      | 1                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 8 0 D 8   | NO  | NO         | 0.1496  | 1.2120  | 0.9632  | 1.5972 |
| 43 | 50      | 10                | si                       | NEG        | POS    |         | 1     | 10 1 D 10 | NO  | NO         | 0.3433  | 16.6395 | 0.7415  | 1.1354 |
| 44 | 52      | 7                 | si                       | POS        | POS    |         | 2     | 15 2 d 15 | SI  | NO         | 0.0980  | 10.9997 | 0.4873  | 0.8471 |
| 45 | 53      | 8                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 11 0 D 11 | NO  | NO         | 0.1977  | 1.1364  | 0.0700  | 0.7711 |
| 46 | 54      | 0                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 6 0 D 6   | NO  | NO         | 0.2792  | 2.0042  | 1.1408  | 0.7863 |
| 47 | 55      | 1                 | no                       | NEG        | POS    |         | 3     | 20 3 D 20 | NO  | NO         | 0.6544  | 1.2359  | 0.3433  | 0.7613 |
| 48 | 56      | 9                 | si                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 13 0 D 13 | NO  | NO         | 1.2306  | 2.2717  | 0.6419  | 1.0756 |
| 49 | 57      | 3                 | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 9 1 D 9   | NO  | NO         | 0.4417  | 7.1655  | 1.7677  | 1.0466 |
| 50 | 58      | 5                 | si                       | NEG        | POS    |         | 2     | 9 2 D 9   | NO  | NO         | 0.6444  | 3.3578  | 1.8200  | 1.6747 |
| 51 | 59      | 10                | no                       | NEG        | POS    |         | 5     | 12 5 D 12 | NO  | NO         | 0.0482  | 22.4472 | 0.6384  | 0.4847 |
| 52 | 60      | 0                 | no                       | NEG        | POS    |         | 1     | 12 1 D 12 | SI  | NO         | 0.2262  | 5.9500  | 1.4791  | 1.3207 |
| 53 | 61      | 1                 | no                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 4 0 D 4   | NO  | NO         | 0.2575  | 1.0812  | 0.8047  | 1.2304 |
| 54 | 62      | 12                | si                       | NEG        | NEG    |         | 0     | 10 0 D 10 | NO  | NO         | 0.3690  | 0.8705  | 0.5231  | 1.2835 |



Apéndice y anexos

|    | CA      | CB                                   | CC                               | CD                               | CE                                       | CF                                  | CG                              | CH                                 | CI                                      | CJ                           | CK                          | CL                          | CM                               |
|----|---------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| 1  | Nº CASO | CD8+<br>estroma<br>intratumor<br>EIT | µm² estroma<br>intratumor<br>EIT | mm² estroma<br>intratumor<br>EIT | CD8+/mm²<br>estroma<br>intratumor<br>EIT | CD8+<br>estroma<br>peritumor<br>EPT | µm³ estroma<br>peritumor<br>EPT | mm²<br>estroma<br>peritumor<br>EPT | CD8+/mm²<br>estroma<br>peritumor<br>EPT | CD8+<br>intraepitelial<br>IE | µm²<br>intraepitelial<br>IE | mm²<br>intraepitelial<br>IE | CD8+/mm²<br>intraepitelial<br>IE |
| 2  | 1       | 93                                   | 126771.5                         | 0.12677153                       | 733                                      | 197                                 | 126893.6                        | 0.12689358                         | 1552                                    | 199                          | 149103.7                    | 0.14910368                  | 1334                             |
| 3  | 2       | 93                                   | 126771.5                         | 0.12677153                       | 733                                      | 115                                 | 46400.4                         | 0.04640037                         | 2478                                    | 0                            | 77805.54                    | 0.077805                    | 0                                |
| 4  | 3       | 48                                   | 99153.4                          | 0.09915343                       | 484                                      | 51                                  | 89885.6                         | 0.08988560                         | 567                                     | 0                            | 96824.5                     | 0.09682448                  | 0                                |
| 5  | 4       | 59                                   | 40982.1                          | 0.04098210                       | 1439                                     | 114                                 | 81021.6                         | 0.08102156                         | 1407                                    | 19                           | 40983.8                     | 0.04098383                  | 463                              |
| 6  | 5       | 12                                   | 13017.1                          | 0.01301707                       | 921                                      | 95                                  | 61875.5                         | 0.06187549                         | 1535                                    | 0                            | 79175.1                     | 0.07917511                  | 0                                |
| 7  | 6       | 6                                    | 15147.5                          | 0.01514753                       | 396                                      | 93                                  | 40062.2                         | 0.04006217                         | 2321                                    | 41                           | 75308.5                     | 0.07530847                  | 544                              |
| 8  | 7       | 58                                   | 32536.9                          | 0.03253689                       | 1782                                     | 67                                  | 17618.6                         | 0.01761855                         | 3802                                    | 4                            | 10624.8                     | 0.01062476                  | 376                              |
| 9  | 9       | 36                                   | 81796.2                          | 0.08179619                       | 440                                      | 60                                  | 51364.4                         | 0.05136436                         | 1168                                    | 1                            | 24076.8                     | 0.02407676                  | 41                               |
| 10 | 11      | 151                                  | 57397.7                          | 0.05739768                       | 2630                                     | 133                                 | 40994.3                         | 0.04099431                         | 3244                                    | 16                           | 75418.4                     | 0.07541842                  | 212                              |
| 11 | 12      | 26                                   | 14939.4                          | 0.01493942                       | 1740                                     | 46                                  | 26898.2                         | 0.02689817                         | 1710                                    | 9                            | 60177.0                     | 0.06017704                  | 149                              |
| 12 | 14      | 63                                   | 27680.6                          | 0.02768058                       | 2275                                     | 17                                  | 22646.5                         | 0.02264654                         | 750                                     | 0                            | 52056.4                     | 0.05205639                  | 0                                |
| 13 | 15      | 9                                    | 10966.5                          | 0.01096650                       | 820                                      | 63                                  | 36446.7                         | 0.03644667                         | 1728                                    | 2                            | 39726.1                     | 0.03972605                  | 50                               |
| 14 | 16      | 8                                    | 20753.4                          | 0.02075338                       | 385                                      | 38                                  | 20752.2                         | 0.02075219                         | 1831                                    | 2                            | 79736.2                     | 0.07973621                  | 25                               |
| 15 | 17      | 74                                   | 43887.1                          | 0.04388708                       | 1686                                     | 61                                  | 64712.5                         | 0.06471247                         | 942                                     | 34                           | 139893.4                    | 0.13989336                  | 243                              |
| 16 | 18      | 19                                   | 16593.0                          | 0.01659300                       | 1145                                     | 33                                  | 15902.3                         | 0.01590227                         | 2075                                    | 4                            | 20067.8                     | 0.02006784                  | 199                              |
| 17 | 19      | 24                                   | 24582.1                          | 0.02458208                       | 976                                      | 28                                  | 33786.0                         | 0.03378602                         | 828                                     | 1                            | 49066.2                     | 0.04906624                  | 20                               |
| 18 | 20      | 45                                   | 30162.1                          | 0.03016209                       | 1491                                     | 41                                  | 15415.2                         | 0.01541522                         | 2659                                    | 3                            | 42136.5                     | 0.04213652                  | 71                               |
| 19 | 21      | 15                                   | 35031.4                          | 0.03503137                       | 428                                      | 103                                 | 85620.7                         | 0.08562067                         | 1202                                    | 0                            | 53459.7                     | 0.05345969                  | 0                                |
| 20 | 22      | 200                                  | 44683.2                          | 0.04468322                       | 4475                                     | 169                                 | 47181.9                         | 0.04718192                         | 3581                                    | 39                           | 57123.6                     | 0.05712362                  | 682                              |
| 21 | 23      | 91                                   | 33349.4                          | 0.03334936                       | 2728                                     | 66                                  | 21183.4                         | 0.02118335                         | 3115                                    | 33                           | 39930.2                     | 0.03993016                  | 826                              |
| 22 | 24      | 19                                   | 6535.4                           | 0.00653540                       | 2907                                     | 99                                  | 26331.5                         | 0.02633145                         | 3759                                    | 7                            | 33854.8                     | 0.03385478                  | 206                              |
| 23 | 25      | 65                                   | 22542.0                          | 0.02254200                       | 2883                                     | 123                                 | 25228.9                         | 0.02522892                         | 4875                                    | 140                          | 68160.0                     | 0.06815996                  | 2053                             |
| 24 | 27      | 110                                  | 53238.4                          | 0.05323838                       | 2066                                     | 181                                 | 50300.3                         | 0.05030031                         | 3598                                    | 1                            | 68064.9                     | 0.06806486                  | 14                               |
| 25 | 28      | 68                                   | 50315.0                          | 0.05031502                       | 1351                                     | 67                                  | 39525.8                         | 0.03952582                         | 1695                                    | 22                           | 68130.9                     | 0.06813088                  | 322                              |
| 26 | 29      | 25                                   | 34948.9                          | 0.03494888                       | 715                                      | 61                                  | 38929.9                         | 0.03892991                         | 1566                                    | 8                            | 46365.2                     | 0.04636524                  | 172                              |
| 27 | 31      | 26                                   | 15584.5                          | 0.01558453                       | 1668                                     | 60                                  | 22544.7                         | 0.02254470                         | 2661                                    | 5                            | 14893.4                     | 0.01489336                  | 335                              |
| 28 | 32      | 3                                    | 5037.7                           | 0.00503772                       | 595                                      | 18                                  | 16899.6                         | 0.01689961                         | 1065                                    | 2                            | 7773.5                      | 0.00777351                  | 257                              |
| 29 | 33      | 14                                   | 2935.2                           | 0.00293515                       | 4769                                     | 7                                   | 7087.6                          | 0.00708764                         | 987                                     | 10                           | 7545.4                      | 0.00754539                  | 1325                             |
| 30 | 34      | 15                                   | 13396.7                          | 0.01339665                       | 1119                                     | 81                                  | 56533.1                         | 0.05653311                         | 1432                                    | 3                            | 13363.6                     | 0.01336357                  | 224                              |
| 31 | 36      | 89                                   | 39995.5                          | 0.03999546                       | 2225                                     | 151                                 | 41319.4                         | 0.04131941                         | 3654                                    | 46                           | 61477.1                     | 0.06147709                  | 748                              |
| 32 | 37      | 9                                    | 12878.4                          | 0.01287836                       | 698                                      | 12                                  | 10382.6                         | 0.01038258                         | 1155                                    | 0                            | 6096.8                      | 0.00609679                  | 0                                |
| 33 | 38      | 43                                   | 37227.2                          | 0.03722724                       | 1155                                     | 52                                  | 37470.6                         | 0.03747060                         | 1387                                    | 19                           | 68300.1                     | 0.06830007                  | 278                              |
| 34 | 39      | 60                                   | 57286.4                          | 0.05728644                       | 1047                                     | 22                                  | 28855.2                         | 0.02885523                         | 762                                     | 11                           | 86620.8                     | 0.08662082                  | 126                              |
| 35 | 40      | 25                                   | 24045.0                          | 0.02404498                       | 1039                                     | 74                                  | 60082.9                         | 0.06008287                         | 1231                                    | 5                            | 22779.6                     | 0.02277963                  | 219                              |
| 36 | 41      | 22                                   | 54844.0                          | 0.05484396                       | 401                                      | 60                                  | 74981.2                         | 0.07498121                         | 800                                     | 2                            | 54150.1                     | 0.05415009                  | 36                               |
| 37 | 42      | 54                                   | 16870.3                          | 0.01687031                       | 3200                                     | 38                                  | 31385.8                         | 0.03138582                         | 1210                                    | 16                           | 47432.2                     | 0.04743220                  | 337                              |
| 38 | 43      | 8                                    | 11382.2                          | 0.01138219                       | 702                                      | 13                                  | 26753.7                         | 0.02675374                         | 485                                     | 11                           | 16517.9                     | 0.01651786                  | 665                              |
| 39 | 44      | 80                                   | 44739.9                          | 0.04473987                       | 1788                                     | 92                                  | 72112.2                         | 0.07211223                         | 1275                                    | 6                            | 43823.8                     | 0.04382384                  | 136                              |
| 40 | 45      | 11                                   | 17697.2                          | 0.01769715                       | 621                                      | 86                                  | 37274.7                         | 0.03727470                         | 2307                                    | 10                           | 32792.3                     | 0.03279225                  | 304                              |
| 41 | 46      | 13                                   | 16439.3                          | 0.01643926                       | 790                                      | 80                                  | 55718.4                         | 0.05571837                         | 1435                                    | 0                            | 11199.8                     | 0.01119981                  | 0                                |
| 42 | 47      | 46                                   | 20507.6                          | 0.02050764                       | 2243                                     | 169                                 | 41143.8                         | 0.04114383                         | 4107                                    | 12                           | 38287.4                     | 0.03828739                  | 313                              |
| 43 | 50      | 96                                   | 24022.2                          | 0.02402217                       | 3996                                     | 91                                  | 31162.5                         | 0.03116246                         | 2920                                    | 30                           | 46934.3                     | 0.04693434                  | 639                              |
| 44 | 52      | 39                                   | 36020.7                          | 0.03602071                       | 1082                                     | 351                                 | 128879.5                        | 0.12887951                         | 2723                                    | 48                           | 29225.8                     | 0.02922584                  | 1642                             |
| 45 | 53      | 10                                   | 19990.3                          | 0.01999033                       | 500                                      | 136                                 | 30897.4                         | 0.03089736                         | 4401                                    | 15                           | 39162.8                     | 0.03916278                  | 383                              |
| 46 | 54      | 104                                  | 23180.8                          | 0.02318083                       | 4486                                     | 176                                 | 46033.2                         | 0.04603322                         | 3823                                    | 72                           | 46523.5                     | 0.04652351                  | 1547                             |
| 47 | 55      | 131                                  | 144882.2                         | 0.14488215                       | 904                                      | 16                                  | 29370.5                         | 0.02937049                         | 544                                     | 4                            | 18337.8                     | 0.01833783                  | 218                              |
| 48 | 56      | 12                                   | 20838.0                          | 0.02083800                       | 575                                      | 38                                  | 23810.48                        | 0.02381048                         | 1595                                    | 14                           | 43744.9                     | 0.04374491                  | 320                              |
| 49 | 57      | 14                                   | 43408.6                          | 0.04340857                       | 322                                      | 121                                 | 33538.1                         | 0.03353812                         | 3607                                    | 17                           | 36082.7                     | 0.03608266                  | 471                              |
| 50 | 58      | 22                                   | 39780.4                          | 0.03978043                       | 553                                      | 96                                  | 4475.2                          | 0.00447522                         | 21451                                   | 127                          | 44514.5                     | 0.04451446                  | 2853                             |
| 51 | 59      | 37                                   | 32259.9                          | 0.03225991                       | 1146                                     | 180                                 | 68799.1                         | 0.06879912                         | 2616                                    | 3                            | 21169.1                     | 0.02116908                  | 141                              |
| 52 | 60      | 3                                    | 22204.9                          | 0.02220490                       | 135                                      | 146                                 | 46660.1                         | 0.04666006                         | 3129                                    | 0                            | 95324.9                     | 0.09532485                  | 0                                |
| 53 | 61      | 89                                   | 41629.0                          | 0.04162904                       | 2137                                     | 23                                  | 13271.5                         | 0.01327146                         | 1733                                    | 6                            | 43794.1                     | 0.04379410                  | 137                              |
| 54 | 62      | 129                                  | 59653.0                          | 0.05965302                       | 2162                                     | 212                                 | 71212.1                         | 0.07121208                         | 2977                                    | 4                            | 57371.0                     | 0.05737098                  | 69                               |